Aus den Forschungslaboratorien der Behringwerke AG
Marburg
Leitung: Professor Dr. Schwick

LYMPHOZYTENSENSIBILISIERUNG IN TUMOR-TRAGENDEN RATTEN: UNTERSUCHUNGEN MIT DEM ELEKTROPHORESE-MOBILITÄTS-TEST

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanbiologie (rer. physiol.)

vorgelegt dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
von

HANS-PETER HARTHUS
aus Oldenburg

Marburg 1979

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus den Forschungslaboratorien der Behringwerke AG
Marburg
Leitung: Professor Dr. Schwick

LYMPHOZYTENSENSIBILISIERUNG IN TUMOR-TRAGENDEN RATTEN: UNTERSUCHUNGEN MIT DEM ELEKTROPHORESE-MOBILITÄTS-TEST

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanbiologie (rer. physiol.)

vorgelegt dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
von

HANS-PETER HARTHUS
aus Oldenburg

Marburg 1979

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen von dem Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am: 26. Sep. 1979

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof.Dr.F.Neurath
Referent: Prof.Dr.W.Ax
Korreferent: Prof.Dr.K.Havemann

Inhaltsverzeichnis

I) Einleitung 1

A) Grundlagen der Tumorimmunologie 1

1) Tumorantigene 1

a) Tumorspezifische Transplantationsantigene 2

b) Tumorassoziierte Antigene 2

B) Nachweis tumorimmunologischer Prozesse 3

1) in vivo 4

2) in vitro 5

a) humorale Reaktionen 5

b) zelluläre Reaktionen 5

C) Testsysteme zur Erkennung von Krebs 5

1) Makrophagen-Migrations-Hemmtest (MMI) 6

2) Leukozyten-Migrations-Hemmtest (LMI) 9

3) Leukozyten-Adhärenz-Hemmtest (LAI) 10

D) Makrophagen-Elektrophorese-Mobilitäts-Test 11

1) Geschichte und Entwicklung 11

2) Funktionsprinzip der Zellelektrophorese 12

3) Antigene 15

4) Klinische Anwendung des MEM-Test 18

5) Mechanismus des MEM-Test 20

E) Weiterentwicklung des MEM-Test zum Elektrophorese-Mobilitäts-Test (EMT) 25

D) Elektrophorese-Mobilitäts-Test 26

1) Literaturübersicht 26

2) Mechanismus des EMT 27

F) Ziele der Arbeit 29

II) Material und Methoden 30

A) Ratten-Tumormodell 30

1) Fischer Ratte 30

2) Tumor R3230AC 30

3) Transplantation des Tumors 31

4) Tumorzellzüchtung in Zellkulturen 31

5) Einfrieren von Tumorzellen 32

6) Optimierung der Metastasierung 32

a) Amputation des Tumors 32

b) Untersuchung der Metastasierung, Vorversuch 33

c) Wachstumskurven nach intraplantarer Injektion der Tumorzellen 33

d) Bestimmung der Parameter für die Metastasierung des Tumors 33

e) Sektionsprotokoll 34

B) Elektrophorese-Mobilitäts-Test (EMT) 34

1) Isolierung der Lymphozyten 34

a) aus dem Blut 34

b) aus der Milz 35

c) aus den Lymphknoten 35

2) Antigene 36

a) Herstellung von HEF (Humaner enzephalitogener Faktor) und REF (Ratten-enzephalitogener Faktor) 36

b) Herstellung von KCl-Extrakten aus dem Primärtumor sowie aus Nieren gesunder Ratten 37

c) Beckmann EAE-Peptid 37

3) Inkubation der Lymphozyten mit Antigen 38

4) Inkubation der Lymphozytenüberstände mit EIZ 38

5) O-Werte 38

6) Zytopherometer 40

7) Fernsehübertragungsanlage 41

8) Bestimmung der Wanderungshemmung 42
a) Stoppuhr 42
b) Bestimmung der tatsächlichen mittleren Wanderungsgeschwindigkeit 42
c) Formel zur Berechnung der Wanderungshemmung 43
d) Statistik 43

C) Mechanismus des EMT 44

1) Wiederholte Stimulation von Lymphozyten mit HEF 44

2) Produktion von EMSF nach Wegnahme des Antigens 44

3) Absorption von EMSF durch EIZ 44

4) Verbleib des Antigens nach Inkubation mit Lymphozyten von Tumorratten und Kontrollen 45

5) Behandlung der Lymphozyten mit Mitomycin bzw. Puromycin 45

D) Fraktionierung, Reinigung und Identifizierung der Antigene 46

1) Amicon-Membran-Filtration 46

2) Säulenchromatographie 47

3) SDS-Polyacrylamid-Diskelektrophorese 48

4) Bestimmung des Molekulargewichts 49

E) Isolierung und Charakterisierung von EMSF 50

1) Kinetik der EMSF-Produktion 50

2) Molekulargewichtsbestimmung von EMSF 50

3) Hitzestabilität von EMSF 50

4) Enzymempfindlichkeit von EMSF 50

5) Induktion von EMSF durch Concanavalin A 51

6) 6 M Harnstoffanalyse von EMSF 52

III) Ergebnisse 53

A) R3230AC Tumormodell 53

1) Adaptation des Tumors an die Fischer Ratte 53

2) Optimierung der Metastasierung 53

a) Tumor-Wachstumskurven nach intraplantarer Injektion der Tumorzellen 53

b) Untersuchung der Metastasierung, Vorversuch 54

c) Bestimmung der Parameter für die Metastasierung des Tumors 55

B) Elektrophorese-Mobilitäts-Test 58

1) Vorversuche mit HEF als Antigen 58

2) Bestimmung der optimalen Parameter 59

a) Antigenkonzentration 59

b) Lymphozytenkonzentration 60

c) EIZ-Konzentration 61

d) Inkubationszeit (Lymphozyten + Antigen) 62

3) Einsatz verschiedener Antigene im EMT 63

a) Ratten EF 63

b) KCl-Extrakt des Tumors R3230AC 63

c) KCl-Extrakt der Niere 66

d) Beckmann EAE-Peptid 66

e) Mitomycin-behandelte Tumorzellen 67

f) Zusammenfassung der Ergebnisse 68

4) Kinetik der Lymphozytensensibilisierung in Tumor-tragenden Ratten 70

a) Kinetik mit $1x10^7$ Tumorzellen (s.c.) und HEF als Antigen 70

b) Zeitliche Bestimmung der ersten meßbaren Sensibilisierung 71

c) Kinetik der Lymphozytensensibilisierung nach Injektion von NaCl bzw. PBS - und HEF als Antigen 73

d) Kinetik der Lymphozytensensibilisierung nach Injektion von allogenen bzw. syngenen Lymphozyten 74
e) Ausschluß arbeitstechnisch bedingter Fehler 75
f) Kinetik der Lymphozytensensibilisierung nach intraplantarer Injektion der Tumorzellen - und HEF bzw. KCl-RAC als Antigen 77
g) Einfluß der Tumorzellkonzentration auf den Verlauf der Kinetik 78
h) Kinetik der Lymphozytensensibilisierung nach Amputation des Primärtumors 80

5) Allgemeine Untersuchungen zum Mechanismus des EMT 83
a) Wiederholte Stimulation mit HEF 83
b) Absorption von EMSF durch EIZ 84
c) Produktion von EMSF nach Wegnahme des Antigens 85
d) Mitomycinbehandlung der Lymphozyten 86
e) Puromycinbehandlung der Lymphozyten 87
f) Verbleib des Antigens nach Inkubation mit Lymphozyten von Tumorratten und Kontrollen 87
g) Einfluß von adhärenten Zellen auf die Produktion von EMSF 89

6) Mechanismus des EMT
a) Eigenwirkung von HEF auf die EIZ
b) Eigenwirkung von KCl-RAC auf die EIZ

7) Fraktionierung, Reinigung und Identifizierung der Antigene 92
a) HEF 92
- Amicon Membran-Filtration 92
- Ionenaustauscherchromatographie 93
- Molekularsiebchromatographie 96
- SDS-Polyacrylamid-Diskelektrophorese 99
b) KCl-RAC 103

8) Untersuchung von EMSF 106
a) Kinetik der EMSF-Produktion 106
b) Bestimmung des Molekulargewichts 107
c) Rückgewinnung des Antigens aus MEF-induzierten Überständen von Tumorratten-Lymphozyten 109
d) Hitzestabilität von EMSF 110
e) Trypsinempfindlichkeit von EMSF 110
f) 6 M Harnstoffanalyse von EMSF 111
9) Induktion von EMSF durch Con A 112
IV) Diskussion 115
A) Indikatorzellen 116
B) O-Wert 118
C) Ratten-Tumormodell 120
D) Antigene 122
E) Kinetik der Lymphozytensensibilisierung 126
F) Einfluß der Metastasierung auf den EMT 130
G) Mechanismus des EMT 131
H) Reinigung der Antigene 134
I) Charakterisierung von EMSF 135
K) Con A-induzierter EMSF 136
V) Zusammenfassung 138
IV) Literaturverzeichnis 140
VII) Lebenslauf 154
VIII) Verzeichnis der akademischen Lehrer 155

Abkürzungen

BCG	Bacillus Calmette-Guerin
BSA	Bovine Serum Albumin
CaBP	Cancer Basic Protein
ConA	Concanavalin A
CEA	Karzinoembryonales Antigen
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DTH	Delayed Type Hypersensitivity Reaction
EAE-Peptid	Experimentelles allergisches enzephalitogenes Peptid (human), Beckmann
EIZ	EMT-Indikator-Zellen
EMSF	Electrophoretic Mobility Slowing Factor
EMT	Elektrophorese-Mobilitäts-Test
FKS	Fetales Kälberserum
Hanks'	Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)
HEF	Humaner enzephalitogener Faktor
KCl-Niere	3 M KCl-Extrakt der Niere
KCl-RAC	3 M KCl-Extrakt des Tumors R3230AC
LAI	Leucocyte Adherence Inhibition
LIF	Leucocyte Inhibition Factor
LMI	Leucocyte Migration Inhibition
MEM	Makrophagen-Elektrophorese-Mobilitäts-Test
MIF	Macrophage Inhibition Factor
MMI	Macrophage Migration Inhibition
MSF	Macrophage Slowing Factor
NR	Normalratte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PML	Polymorphkernige Leukozyten
PPD	Purified Protein Derivat
R3230AC	Ratten 3230 Adenokarzinom
REF	Ratten-enzephalitogener Faktor
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAA	Tumorassoziiertes Antigen
TEEM	Tanned Erythrocyte Electrophoretic Mobility Test
TR	Tumorratte
TSTA	Tumorspezifische Transplantationsantigene

I) Einleitung

A) Grundlagen der Tumorimmunologie

Obwohl die Tumorimmunologie heutzutage einen Schwerpunkt innerhalb der immunologischen Forschung einnimmt, steckt die klinische Tumorimmunologie noch in ihren Anfängen. Die erklärten Ziele: Entwicklung von Techniken für die (Früh-)Diagnose und die diagnostische Beurteilung von Tumorerkrankungen, sowie die Durchführung einer Immuntherapie sind bis heute nicht voll erreicht worden.
Es besteht jedoch kein Zweifel mehr, daß Immunreaktionen bei der Tumorabwehr eine bedeutende, wenn nicht sogar entscheidende Rolle spielen (Götz, Bücherl 1975).

Diese Feststellung impliziert natürlich die Existenz von tumorspezifischen und/oder tumorassoziierten Antigenen, die Normalzellen nicht besitzen, und die Fähigkeit des Organismus gegen diese Antigene eine Immunität zu entwickeln.

1) Tumorantigene

Obwohl tumorspezifische Reaktionen schon seit dem späten 19. Jahrhundert bekannt sind, waren erste auswertbare Erkenntnisse erst durch die Grundlagen der Transplantationsimmunologie sowie das Vorhandensein von syngenen Tierstämmen möglich. Inzuchttiere boten die Möglichkeit, durch Verwendung von syngenem Tiermaterial immunologische Reaktionen gegen allogene Gewebe auszuschließen.
Definitive Beweise für die Existenz von TSTA kamen dann 1953 von Foley. Er konnte zeigen, daß ingezüchtete Mäusestämme in der Lage waren, syngene oder allogene chemisch induzierte Tumoren, gegen die sie vorher immunisiert worden waren, abzustoßen. Durch das Aufkommen besserer Techniken wurden weitere Tumoren gefunden, die nach vorheriger Immunisierung von syngenen Tieren abgestoßen wurden, also immunogen waren. Es galt daraufhin als akzeptiert, daß TSTA auf der Oberfläche von Tumorzellen existieren, die entweder chemisch, viral oder

physikalisch-chemisch induziert sind (Old, Boyse 1964). Eine allgemein gültige Einteilung von Tumorantigenen hat sich bisher nicht aufstellen lassen (Klein 1966, Bauer 1974, Alexander 1972). Einhergehend mit ihren biologischen Eigenschaften werden die Tumorantigene grob in TSTA und TAA eingeteilt.

a) TSTA

TSTA sind stets membrangebunden und spezifisch für den malignen Zustand einer Zelle. Sie dürfen also auf normalen Zellen nicht existieren oder gefunden werden. Sie werden als TSTA bezeichnet, da sie zu Abwehrreaktionen führen, die dieselben Gesetzmäßigkeiten zeigen wie die Transplantations-Abstoßungsreaktionen. Die Entstehung solcher TSTA ist möglich entweder durch Neubildung = Neoantigene oder aber durch Verlust von Zellmaterial = Deletion. TSTA können unabhängig von der Individualspezifität des Tumorträgers den TSTA von Tumorzellen anderer Individuen absolut entsprechen, wenn die Tumoren z.B. durch dasselbe Virus verursacht worden sind. Meistens sind die TSTA jedoch tumor- und individualspezifisch.

b) TAA

Neben den TSTA gibt es die sogenannten TAA. Zwischen TSTA und TAA besteht ein funktioneller Unterschied, da TAA definitionsgemäß nicht als Transplantationsantigene wirken können und damit keine immunologische Tumorabstoßung herbeiführen können. Zu ihnen gehören z.B. die im Serum nachweisbaren karzinoembryonalen Antigene und die Differenzierungsantigene.
Da Tumorantigne per definitionem neue Antigene darstellen, gehören z.B. das karzinoembryonale Antigen (CEA) und das Alpha-Fetoprotein nicht zu den Tumorantigenen im strengen Sinn, da sie auch im Gesunden vorkommen und bei bestimmten Tumoren nur in erhöhter Konzentration nachweisbar sind. Embryonale Antigene sind nicht immuno-

gen, da sich wahrscheinlich während der Embryonalzeit eine Toleranz aufgebaut hat, die dann beim Erwachsenen durch minimalste Konzentrationen aufrecht erhalten wird.
Bei Virus-induzierten Tumoren der Tiere treten oft noch Virus-Strukturproteine als Antigene auf der Zelloberfläche auf (Bauer 1974, Kurth 1976, Schäfer 1977).

Problematisch in bezug auf Tumorantigene, insbesondere TSTA, haben sich bisher die spontanen Tiertumoren erwiesen. Es gibt sehr viele spontane Tiertumoren, bei denen ein Nachweis von TSTA noch nicht gelungen ist. Dies mag unter anderem an technischen Schwierigkeiten liegen. Auf der anderen Seite schließt eine nicht nachweisbare Abstoßungsreaktion eine immunologische Tumor-Wirt-Beziehung aber nicht aus. Es gibt viele Mechanismen, durch die TSTA einer Abwehr des Immunsystems entkommen können (Alexander 1974).

B) Nachweis tumorimmunologischer Prozesse

Ziel immunologischer Untersuchungen muß es also sein, Tumorantigene nachzuweisen und die Entwicklung von Immunreaktionen gegen diese Antigene zu verfolgen.

Welche Möglichkeiten existieren nun heute, tumorimmunologische Prozesse nachzuweisen? Da der Organismus sowohl humoral als auch zellulär auf die Tumorantigene reagiert, beziehen sich die in vitro Methoden zum einen auf den Nachweis zellulärer Mechanismen und zum anderen auf den Nachweis von Antikörpern.
Da die zellulären Immunreaktionen gegen den Tumor eine wesentlich größere Bedeutung haben, soll in diesem Zusammenhang kurz auf die Lymphokine eingegangen werden.

Bei der zellulären Immunität haben wir es nicht nur mit Zell-Zell-Interaktionen zu tun, sondern auch mit löslichen Faktoren, Lymphokinen. Diese lassen sich je nach ihrer Wirkung in drei Kategorien einteilen:
I) Lymphokine mit toxischer Wirkung auf die Zielzelle

II) Lymphokine mit proliferativer Wirkung auf die Zielzelle

III) Lymphokine mit modulierender Wirkung auf Entzündungsprozesse

A) Beeinflussung der Migration von "inflammatory cells"

B) Veränderung der Oberflächeneigenschaften der Zielzelle

C) Beeinflussung biochemischer Aktivitäten der Zielzelle

D) Aktivierung in bezug auf Phagozytose und "Killing"

Es wurde sehr bald postuliert, daß Lymphokine die verantwortlichen Faktoren für viele in vivo Manifestationen zellvermittelter Immunität sind. Diese Vermutung konnte sehr bald erhärtet und bewiesen werden. Lymphokine wurden in vivo an Stellen, an denen zellvermittelte Immunreaktionen ablaufen, gefunden (Cohen et al. 1973, Sonozaki et al. 1975). Biologisch bedeutsame zelluläre Reaktionen konnten durch die Gabe exogener Lymphokine induziert werden (Yoshida et al. 1973, Bennett u. Bloom 1968, Pick et al. 1969). Außerdem konnte gezeigt werden, daß Antikörper gegen Lymphokine einen suppressiven Effekt auf zelluläre Immunreaktionen in vivo ausüben (Yoshida et al.1975, Geczy et al. 1975).

Alle diese Daten unterstreichen die biologisch wichtige Bedeutung von Lymphokinen, auch wenn diese bisher noch nicht exakt biochemisch charakterisiert sind, und ein noch genaueres Studium der Funktion daher noch nicht möglich ist.

Für den Nachweis von Tumor-Wirt-Beziehungen kommen heute folgende Methoden in Frage:

1) in vivo

a) Aktive Immunisierung gegen Tumorantigene

b) Indirekter Nachweis der Immunität durch passive Immunisierung mittels Immunseren oder Immunzellen

c) Kutanreaktionen im Sinne einer Delayed Type Hypersensitivity Reaction mit Tumorantigenen

2) in vitro

a) humoral

Nachweis zirkulierender Antikörper gegen Tumorantigene:

- Immunpräzipitationstest
- Komplementfixationstest
- Immunfluoreszenztest
- Radioimmunoassay
- Mixed Hämagglutinationstest
- Zytotoxizitätstests zum Nachweis zytotoxischer Antikörper
- Zytoadhärenz

b) zellulär

- Zytotoxizitätstests
  Isotope Release Assay
  Farbstoffexklusionstest
  Mikrozytotoxizitätstest nach Takasugi und Klein
- Mixed Lymphocyte Tumor Cell Culture
- Nachweis von Lymphokinen
  Makrophagen-Migrations-Hemmtest (MMI)
  Leukozyten-Migrations-Hemmtest (LMI)
  Makrophagen-Elektrophorese-Mobilitäts-Test (MEM)
  Elektrophorese-Mobilitäts-Test (EMT)

C) Testsysteme zur Erkennung von Krebs

Immunologische Methoden haben eine potentielle Bedeutung für die Diagnose von Krebs. In den letzten Jahren konnten Testsysteme mit hoher Spezifität entwickelt werden, und einige Antigene können heute in Picogramm oder sogar Nanogramm bestimmt werden. Diese Empfindlichkeit könnte für die Auffindung nur weniger neoplastischer Zellen sehr wichtig sein. Das Wichtigste an immunologischen Methoden dürfte aber ihre Spezifität sein, die es ermöglicht, Antigene auf Grund geringster Unterschiede (im Extremfall Austausch nur

einer Aminosäure) voneinander zu differenzieren.
Nicht alle aufgeführten Methoden zum Nachweis immunologischer Tumor-Wirt-Beziehungen eignen sich jedoch für die klinischen Fragestellungen, d.h. Diagnose und Prognose von Tumorerkrankungen. Obwohl auch für zahlreiche menschliche Tumoren TAA nachgewiesen worden sind, sind die Methoden meistens noch zu aufwendig und schwierig in ihrer technischen Handhabung, um sie in der Klinik für Routineuntersuchungen einzusetzen.
Für klinische Routineuntersuchungen kommen heute nur Serumuntersuchungen zum Nachweis von Tumoren in Frage, und damit die Untersuchung von embryonalen Antigenen. Die wichtigsten Methoden beziehen sich auf den Nachweis von Alpha-1-Fetoprotein (spezifisch für primäre Tumoren der Leber), CEA (vornehmlich bei Tumoren des Verdauungstrakts, aber auch zahlreichen anderen Tumoren) und auf das sogenannte Regan-Isoenzym der alkalischen Phosphatase, welches bei 10-20% aller Patienten mit malignen Erkrankungen, möglicherweise besonders bei gynäkologischen Tumoren, im Serum nachgewiesen werden kann.
Wegen der großen Bedeutung der zellulären Immunreaktionen bei der Abstoßung von Tumoren wäre ein Nachweis dieser Reaktionen zum Bestimmen der Immunitätslage besonders wichtig. Verhältnismäßig einfach ist die Bestimmung von Lymphokinen als Nachweis der zellulären Immunität. In vitro Methoden, die dem Nachweis von Lymphokinen gelten, sollen daher im folgenden Abschnitt ausführlicher behandelt werden.

1) Makrophagen-Migrations-Hemmtest

Da der Makrophagen-Elektrophorese-Mobilitäts-Test eine Weiterentwicklung des MMI ist, soll in diesem Abschnitt die Geschichte des MMI ebenfalls mitbehandelt werden.
Die Entwicklung des MMI-Test hat ihren Ursprung in der Untersuchung der Hautreaktion vom verzögerten Typ (DTH).

Klassisch hierfür ist die Tuberkulin-Reaktion, die 1890 zum ersten Mal von Koch beschrieben wurde. Sie tritt auf, wenn man Menschen oder Tieren, die eine Tuberkel-Infektion durchgemacht haben, intracutan Tuberkulin injiziert. Makroskopisch zeigt sich nach etwa 24 Stunden eine Rötung und Schwellung der Haut. Histologisch findet man ein Zellinfiltrat, daß je nach Zeitpunkt der Untersuchung eine unterschiedliche Zellzusammensetzung hat. Nach 24-48 Stunden jedoch findet man das charakteristische Bild eines ausgedehnten mononukleären Zellinfiltrats.

Bei der Untersuchung der DTH stieß man zunächst auf die Tatsache, daß nur ein ganz geringer Teil der infiltrierten Zellen sensibilisiert sind. Es wurde daraufhin vermutet, daß diese spezifisch sensibilisierten Zellen durch einen bestimmten Mechanismus zu einer langsam verlaufenden, nicht spezifischen entzündlichen Reaktion führen.

Ein wichtiger Schritt zur Aufklärung dieses Mechanismus war die Entdeckung der Makrophagen-Migrationshemmung. Bereits 1928 konnten Rich und Lewis zeigen, daß nach Zusatz von Tuberkulin in eine Kultur von sensibilisierten Milzzellen oder Makrophagen die Migration der Zellen gehemmt war. Diese Untersuchungen konnten dann 1964 von David und Mitarbeitern spezifiziert werden, nachdem George und Vaughan 1962 den Makrophagen-Migrations-Hemmtest in Form der Kapillarmethode entwickelt hatten. David und Mitarbeiter konnten zeigen, daß die Zugabe eines spezifischen Antigens das Auswandern sensibilisierter Makrophagen aus den Kapillarröhrchen verhindert.

Der Mechanismus der DTH war damit aber noch nicht geklärt. Es fehlte das Bindeglied zwischen der Sensibilisierung weniger Zellen und dem zahlreichen Auftreten der sogenannten "inflammatory cells".

Der Schlüssel zu diesem Problem wurde 1966 unabhängig von Bloom und David gefunden. Sie konnten zeigen, daß die Migrationshemmung durch einen löslichen Faktor her-

vorgerufen wird, und daß dieser Faktor von den sensibilisierten Lymphozyten nach Antigenkontakt gebildet wird. Damit war das Prinzip des MMI geklärt, und man war im Besitz einer wichtigen Methode zum Nachweis zellulärer Immunität. Der gebildete Faktor wurde als Makrophagen-Migrations-Hemmfaktor bezeichnet (MIF= Migration Inhibition Factor).
Man unterscheidet seitdem zwei verschiedene Methoden des MMI:

I) Direkter MMI: MIF-bildende Lymphozyten und Makrophagen werden in einer Glaskapillare gleichzeitig dem Antigen ausgesetzt.

II) Indirekter MMI: Lymphozyten werden zunächst mit dem Antigen inkubiert und die Makrophagen dann nur mit dem Überstand getestet.

Erste Untersuchungen mit Tumorzellen als Antigen im MMI wurden 1969 von Kronman et al. gemacht. Er konnte zeigen, daß die Migration von Meerschweinchen-Peritoneal-Exudatzellen nach vorheriger Immunisierung mit Diäthylnitrosamin-induzierten Hepatomzellen in Gegenwart der spezifischen lebenden Tumorzelle als Antigen gehemmt war. Nicht studiert wurde in diesen Untersuchungen die Produktion und der Nachweis von MIF.
Bloom und Bennett (1969) erhielten ähnliche Ergebnisse. Makrophagen von Meerschweinchen, immunisiert mit Methylcholanthrene- oder Dimethylbenzanthrazene-induzierten Tumoren, konnten in vitro durch das jeweilige spezifische Antigen gehemmt werden. Es existierte keine Kreuzspezifität zwischen den einzelnen Tumorzellinien. Sie konnten in ihren Versuchen die Produktion von MIF nachweisen, indem sie Überstände von Lymphozyten und Antigen mit Makrophagen testeten und auch hier eine Hemmung der Indikatorzellen auftrat.

Folgende Studien (Suter et al. 1972) zeigten, daß der MMI geeignet ist, Oberflächenantigene von verschiedenen chemisch-induzierten Tumoren voneinander zu unterscheiden. In bezug auf die Antigenmenge, die zu einer posi-

tiven Reaktion führt, war der MMI schon bald der Kutanreaktion (DTH) überlegen.
Außer bei Meerschweinchen konnte der MMI auch bei Mäusen mit Methylcholanthrene-induzierten Tumoren erfolgreich angewendet werden (Halliday u. Webb, 1969).
Weitere Studien von Halliday zeigten, daß auch lösliche Tumorantigene spezifische Reaktionen hervorrufen.
Über die Anwendung des MMI im Humansystem gibt es nur wenige Arbeiten (Hilberg et al. 1973, Churchill 1973). Ihnen zugrunde liegt eine Technik, die von Thor et al. 1968 entwickelt worden ist. Er konnte nachweisen, daß Überstände von humanen Lymphozyten, sensibilisiert gegen PPD oder Candida albicans, nach Inkubation mit dem spezifischen Antigen Meerschweinchen-Makrophagen hemmen. So konnte Hilberg z.B. die Sensibilisierung von humanen Blutlymphozyten nachweisen, indem er sie mit Tumorextrakten inkubierte und die Überstände mit Meerschweinchen-Makrophagen testete.
Es folgten dann mehrere Studien über die Anwendung des MMI im Humansystem (Vaage et al. 1972, Rees u. Potter 1973, Harrington 1974, Jones u. Turnball 1975), die jedoch alle die Brauchbarkeit des MMI zeigten, nicht aber seine Überlegenheit über andere Testsysteme.

2) Leukozyten-Migrations-Hemmtest (LMI)

Besser zugängliche Indikatorzellen beim Menschen zum Nachweis von Lymphokinen wären natürlich periphere Blutleukozyten. Bendixen und Soborg (1967) beschrieben zum ersten Mal einen Migrations-Hemmtest mit peripheren Blutleukozyten als Wanderzellen. Soborg (1967, 1968) und Bendixen (1967) demonstrierten, daß Patienten mit einer DTH gegenüber Brucella Antigen auch im LMI eine verminderte Auswanderung der PML in Gegenwart des Antigens zeigten.
Rocklin konnte dann 1974 zeigen, daß es bei dem IMI ebenfalls zu einer Lymphokinbildung kommt. Man nannte

daraufhin diesen Faktor Leucocyte Inhibition Factor (LIF). Rocklin konnte ebenfalls nachweisen, daß es sich bei MIF und LIF um physiko-chemisch unterschiedliche Substanzen handelt.
Der LMI wurde dann ebenfalls zur Untersuchung von Tumorerkrankungen eingesetzt und auch erfolgreich angewendet: (McCoy et al. 1974, Cochran et al. 1974).

1971 erfand Clausen den Leukozyten-Migrations-Hemmtest unter Agarose. Astor et al.(1973) konnten zeigen, daß auch diese Modifikation eine gute Korrelation zur DTH hat. Die Brauchbarkeit dieses Tests zur Untersuchung von Tumorpatienten wurde durch Untersuchungen des Melanoms und des Lungenkrebses beim Menschen nachgewiesen (Boddie et al. 1975, Spitler 1974, Tautz et al. 1974).

3) Leukozyten-Adhärenz-Hemmtest (LAI)

Halliday et al. (1974) konnten zeigen, daß die Glasadhäsion von Leukozyten eines Tumorpatienten nach Inkubation mit dem spezifischen Antigen in Normalserum vermindert ist. Diese Erscheinung kann durch Zugabe von Serum des betreffenden Patienten wieder rückgängig gemacht werden. Patienten mit Melanom oder primärem Hepatom zeigten im LAI eine positive Reaktion mit Tumorantigenen desselben histologischen Typs. Mit Antigenen von Normalgewebe konnten keine positiven Resultate erzielt werden.
Der Mechanismus konnte bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Während Halliday und Malnish (1975) die Bildung eines Lymphokins nachweisen konnten, waren Holan et al.(1974) nicht in der Lage dies zu bestätigen. Sie wiesen einen direkten Zellkontakt nach. Außerdem ist bis heute nicht vollständig geklärt, welche Zellpopulation für die Adhärenz verantwortlich ist.

D) Makrophagen-Elektrophorese-Mobilitäts-Test

1) Geschichte und Entwicklung

Makrophagen zeigen in einem Versuchsansatz zur Bestimmung ihrer Migrationshemmung bei zellulären Immunreaktionen nicht nur eine inhibierte Auswanderungstendenz, sondern auch eine deutliche Verringerung ihrer Oberflächenladung.
Bereits 1967 konnten Sundaram et al. zeigen, daß Lymphozyten aus Lymphknoten sensibilisierter Tiere nach Inkubation mit dem spezifischen Antigen eine verlangsamte elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit haben.
Diengdoh und Turk konnten diese Untersuchungen 1968 für sensibilisierte Meerschweinchen-Peritoneal-Exudat-Zellen bestätigen.
1969 zeigten Bert et al., daß humane Lymphozyten aus dem peripheren Blut in Gegenwart des Antigens, gegen das sie sensibilisiert sind, eine deutliche Verlangsamung der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit zeigen.
1970 konnten Hughes et al. die Ergebnisse von Diengdoh und Turk bestätigen, indem sie MMI und EMR = Electrophoretic Mobility Reduction am Modell der PPD- und EF-Sensibilisierung verglichen und zu parallelen Ergebnissen kamen. Diese Untersuchungen wurden mit Meerschweinchen durchgeführt.
In einer weiteren Arbeit vermutete Caspary (1970), daß der EMR derselbe Mechanismus zugrunde liegt wie dem MMI, also die Bildung eines Lymphokins, das dann die elektrophoretische Beweglichkeit der Makrophagen herabsetzt. Bewiesen werden konnte diese Vermutung jedoch noch nicht.

Ausgehend von diesen Tatsachen versuchten Field et al., die Bildung eines Lymphokins von sensibilisierten, humanen peripheren Lymphozyten durch Beeinflussung der passiven Wanderung von Meerschweinchen-Peritoneal-Exudat-Makrophagen nachzuweisen. Dieses Prinzip erwies sich als

richtig, und man bezeichnete diesen Test nun als Makrophagen-Elektrophorese-Mobilitäts-Test. Der vermutete Faktor, der die Wanderungsgeschwindigkeit herabsetzt, bekam die Bezeichnung Macrophage Slowing Factor (MSF).

Die erste umfassende Arbeit, bei der die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit von Makrophagen als Maß für den Nachweis zellulärer Immunität eingesetzt wurde, erschien 1970 von Field und Caspary.

Es handelte sich dabei um eine Untersuchung von Patienten mit neurologischen Erkrankungen, bei der sie als Antigen den enzephalitogenen Faktor, EF, verwendeten. Völlig überraschend ergab sich jedoch, daß neben den erwarteten positiven Reaktionen bei Patienten mit neurologischen Erkrankungen alle Patienten mit einem malignen Tumor, nicht aber die mit benignen Erkrankungen, positiv reagierten.
Damit war der MEM als Methode zur Erkennung von Krebs entdeckt, und Field und Caspary schrieben 1970:" If certain clearly defined limitations are observed, this lymphocyte sensitization could be employed as a diagnostic or screening procedure. The significance of this test is not clear."

2) Funktionsprinzip

Bei der Zellelektrophorese wird die Wanderung einzelner Zellen im elektrischen Feld mikroskopisch beobachtet und ihre Wanderung entlang einer bestimmten Strecke und bei vorgegebenen Bedingungen, wie z.B. konstanter Feldstärke, gemessen.
Grundbaustein einer Zellelektrophorese-Apparatur ist eine durchsichtige, temperierbare Kammer, an deren Enden die Elektrodensysteme angeschlossen werden können. Die Kammer kann entweder einen kreisförmigen oder rechteckigen Querschnitt besitzen. Erste Untersuchungen der Zellelektrophorese mit einer zylindrischen Kammer gehen auf Bangham und Mitarbeiter (1958) sowie auf Seaman (1961) zurück. Innerhalb des geschlossenen Glaszylin-

ders ist die elektroosmotische Strömung der Trägerflüssigkeit an der Kammerwand zur Kathode gerichtet, der axial verlaufende Flüssigkeitsrückstrom zur Anode. Zwischen diesen beiden Flüssigkeitsschichten existiert eine zylindrische Schicht, in der keine elektroosmotischen Flüssigkeitsströmungen auftreten, und die daher zur Messung der wirklichen Wanderungsgeschwindigkeit benutzt werden kann. Man bezeichnet diese Schicht auch als stationäre Ebene. Ihr Abstand von der Kammerwand muß mathematisch errechnet werden.

Die Zellelektrophorese mit einer rechteckigen Kammer wurde von Fuhrmann und Ruhenstroth-Bauer (1965), Sachtleben und Mitarbeitern (1967) sowie Stoltz und Mitarbeitern (1969) entwickelt. Bei diesem Meßprinzip kommt es durch die elektroosmotische Flüssigkeitsströmung zur Ausbildung von zwei stationären Ebenen, die jeweils an der vorderen bzw. hinteren Kammerwand liegen, und deren Abstand von der Kammerwand ebenfalls mathematisch errechnet werden muß. Die Lage dieser Ebenen hängt von der Kammergeometrie, insbesondere von der Kammerhöhe und der Kammertiefe ab.

Ein nach diesem Prinzip arbeitendes Gerät ist das Zytopherometer (Zeiss).

Wie kommt es nun zur Wanderung von Makrophagen oder Zellen allgemein? Hierzu muß man sich die biologische Struktur der Zellmembran kurz vor Augen halten. Das Grundgerüst besteht aus einer Lipiddoppelschicht mit einem äußeren wie inneren Proteinfilm. Durch die unterschiedliche Verteilung der Ionen der in der Membran enthaltenen Elektrolyte, sowie durch die verschiedenen Ionisierungsgrade der einzelnen Proteine, kommt es zu einer fixierten Ladungsdichte am äußeren Rand der Zellmembran und somit zu einer Nettoladung der Zelle. Bei der Zellelektrophorese kommt es nun zu einem elektrischen Potentialsprung zwischen der Zellaußenmembran und dem Suspensionsmedium. Das elektrophoretisch meßbare Adäquat der Zelloberflächenladung ist dabei das sogenannte Zeta-

potential. Für den Zusammenhang zwischen der Wanderungsgeschwindigkeit und dem Zetapotential gelten die Grundlagen der elektrokinetischen Erscheinungen, die hier aber nicht weiter ausgeführt werden sollen.
Das Prinzip der Zellelektrophorese wurde bisher zu den verschiedensten Zwecken angewand: Ambrose (1965) und Lichtman (1970) konnten zeigen, daß durch Enzymbehandlung, z.B. mit Neuraminidase, charakteristische Veränderungen der Oberflächenladung erzielt wurden, die wiederum Rückschlüsse auf die Zusammensetzung der Zellmembran zuließen.
Beim Menschen konnten den verschiedenen Blutzellen spezifische Wanderungsgeschwindigkeiten zugeordnet werden, die sich bei verschiedenen Erkrankungen in markanter Weise ändern.
Ambrose konnte 1956 mit Hilfe der Zellelektrophorese maligne und gesunde Zellen voneinander unterscheiden.

1968 konnten Ruhenstroth-Bauer und Mitarbeiter erstmals das Vorhandensein von zwei elektrophoretisch unterschiedlichen Lymphozytenpopulationen im Wertebereich dieser Zellen in verschiedenen lymphatischen Organen der Ratte nachweisen. Diese Subpopulationen wurden später von Häyry et al. (1972) als T- und B-Zellen klassifiziert.
Field und Caspary (1970) machten sich das Prinzip der Zellelektrophorese zur Bestimmung der Wanderungsgeschwindigkeit von Makrophagen als Maß der zellulären Immunität zueigen. Das Prinzip besteht darin, daß sensibilisierte Lymphozyten nach Inkubation mit dem spezifischen Antigen einen Faktor freisetzen, der die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit von Makrophagen herabsetzt. Dieser Faktor wurde als MSF (Macrophage Slowing Factor) bezeichnet. Er gilt als ein Adäquat zum MIF, eine Identität beider Faktoren konnte aber bis heute nicht eindeutig nachgewiesen werden.

3) Antigene

Enzephalitogener Faktor

Das von Caspary und Field benutzte Antigen zur Untersuchung von neurologischen Erkrankungen war ein basischer Myelinextrakt aus menschlichem Gehirn, der von ihnen als EF = enzephalitogener Faktor bezeichnet wurde (Caspary u. Field 1971). Zusammen mit Freund's Adjuvants ergab sich nach Injektion in Meerschweinchen sehr rasch eine allergische Enzephalomyelitis.
Da Tumorpatienten mit diesem Extrakt ebenfalls positiv reagierten, nahmen Caspary und Field an, daß EF auch hier das verantwortliche Antigen darstellt.
Die Tatsache, daß alle Personen mit einem malignen Tumor mit diesem Antigen positiv reagierten, nicht aber solche mit benignen Erkrankungen, ließen dieses Antigen sehr interessant erscheinen. Die Sensibilisierung war also unabhängig von der Art des Tumors, allerdings auch scheinbar unabhängig von dem klinischen Stadium des Patienten.
Eine genauere Charakterisierung des vermuteten Antigens erfolgte zum großen Teil indirekt durch die Erforschung der EAE = experimentelle allergische Enzephalomyelitis, hervorgerufen durch eben dieses Antigen, das auch im MEM eingesetzt wird.
Es war bekannt, daß ein "ungewöhnliches" basisches Protein, das etwa 30% des gesamten Myelinproteins ausmacht (Eng et al. 1968) und durch Säureextraktion aus dem Gehirn gewonnen werden kann, die EAE in Meerschweinchen induziert (Alvord et al. 1968). Die Isolation und Charakterisierung des Antigens zur Erzeugung einer EAE erfolgte in verschiedenen Laboratorien. Es konnte gezeigt werden, daß EF ein Molekulargewicht von 14.-19.000d hat und einen isoelektrischen Punkt größer 10,5 (Oshiro u. Eylar 1970, Eylar u. Thompson 1969, Palmer u. Dawson 1969). In seinen physikalischen Eigenschaften ist es dem entsprechenden Antigen aus Rinderhirn sehr ähnlich (Carnegie 1971). Die Aminosäuresequenz des gesamten Proteins konnte ebenfalls bestimmt werden (Carnegie 1969a,

Carnegie 1969b, Carnegie 1971).
Für das Protein aus menschlichem Gehirn wurde die entscheidende Aminosäuresequenz der antigenen Determinante von Lennon et al. (1970) bestimmt: Ser-Arg-Phe-Ser-Trp-Gly-Ala-Glu-Gly-Gln.
1971 setzten Field et al. ein der antigenen Komponente im EF entsprechendes synthetisches Peptid (Westall et al. 1971, Lennon et al. 1970) im MEM ein und erhielten damit ebenfalls positive Ergebnisse bei Patienten mit malignen Tumoren. Damit erschien es als gegeben, daß die Determinante, die mit Lymphozyten von Tumorpatienten reagiert, identisch ist mit der, die die EAE in Meerschweinchen hervorruft. Einer Theorie von Carnegie folgend, daß Serotonin eine dem EF komplementäre Struktur hat, und daher die Reaktion hemmen müßte, wurden solche Versuche mit Tumorpatienten und EF unternommen. Die Reaktion konnte tatsächlich mit Serotonin gehemmt werden (Field et al. 1971).

Cancer Basic Protein

Schon 1970 vermuteten Field und Caspary, daß auf den Tumorzellen eine dem EF verwandte Struktur vorhanden sein müßte. Es sollte also möglich sein, dieses Protein nach demselben Extraktionsverfahren wie für EF von Tumorzellen zu isolieren. Von verschiedenen menschlichen Tumoren wurden daraufhin Säureextrakte hergestellt und im MEM eingesetzt. Es stellte sich heraus, daß diese Antigene ebenfalls zu einer positiven Antwort bei allen Tumorpatienten führten, und daß die Antwort sogar besser war als mit EF (Caspary u. Field 1971). Man nannte daraufhin diesen Extrakt CaBP.
CaBP ist im Unterschied zu EF nicht enzephalitogen, auch nicht in sehr hohen Dosen. Ein erster Zusammenhang zwischen CaBP und EF zeichnete sich jedoch schon dadurch ab, daß die Reaktion von Tumorpatienten mit CaBP ebenfalls durch Serotonin gehemmt werden konnte, wenn auch nicht in dem Ausmaß wie bei EF. 1971 untersuchten Carnegie et al. das CaBP genauer. Sie konnten

ein Molekulargewicht von 16.000d bestimmen und fanden außerdem heraus, daß das CaBP einen Tryptophanrest besitzt. Benigne Tumoren ergaben ähnliche Proteine, die jedoch im MEM nicht antigen waren.
Durch Behandlung des CaBP mit 2-Hydroxy-5-Nitrobenzyl-Bromid konnte gezeigt werden, daß Tryptophan ein essentieller Bestandteil des CaBP ist, ähnlich also dem EF.

1972 zeigten Dickinson et al., daß sich das CaBP tatsächlich auf der Oberfläche der Plasmamembran von Tumorzellen befindet. 1973 folgten weitere ausführliche Untersuchungen über das CaBP (Dickinson et al). Sie konnten die antigene Eigenschaft des CaBP im MEM bestätigen und zeigen, daß normale Zellen so gut wie kein dem CaBP entsprechendes Antigen besitzen. Weiterhin fanden sie, daß hyperplastisches Gewebe kein CaBP enthält, daß Leukämiezellen dasselbe CaBP besitzen wie solide Tumoren, normale Lymphozyten dieses Antigen jedoch nicht besitzen. Sie konnten nachweisen, daß das CaBP Proteolipid-Eigenschaften hat, und daß die antigene Determinante in einem kleinen Fragment (ca. 4000d) des Gesamtproteins enthalten ist.
Mit Hilfe der zellulären Affinitätschromatographie konnten Dermott et al. (1974) eine Kreuzreaktivität zwischen EF und CaBP nachweisen. Ein weiterer Beweis für die Kreuzreaktivität konnte 1975 von Coates et al. mit Hilfe der Lymphozytentransformation erbracht werden. Nach Injektion von CaBP zeigten Meerschweinchen-Lymphozyten in vitro eine deutlich erhöhte Reaktivität gegenüber EF und umgekehrt. Lymphozyten unbehandelter Tiere zeigten weder gegenüber EF noch CaBP eine Reaktivität.

KCl-Extrakte

Wie bereits erwähnt können mit EF bzw. CaBP keine Rückschlüsse auf die Lokalisation des Tumors gemacht werden. Die Sensibilisierung ist also unabhängig von der Art des Tumors.
Ein bedeutender Schritt in Richtung organspezifischer Tumordiagnose gelang Müller et al. (1975) durch den Einsatz von KCl-Extrakten von verschiedenen Tumoren

sowie von Normalgewebe im MEM.
KCl-Extrakte von Tumoren sind zum ersten Mal 1971 von Meltzer et al. beschrieben worden. Sie konnten zeigen, daß ähnlich der Extraktion von Histokompatibilitätsantigenen lösliche Tumorantigne durch 3 M KCl-Extraktion gewonnen werden können. Die antigene Aktivität blieb erhalten und betrug 15-40% der von intakten Zellen. Dies konnten sie anhand der DTH-Reaktion zeigen. Die antigene Spezifität zweier Extrakte verschiedener Tumoren blieb ebenfalls erhalten. Außerdem sind die löslichen Antigene so stabil, daß man sie mit allgemein üblichen Methoden reinigen konnte.
Durch Verwendung so hergestellter KCl-Extrakte gelangen Müller et al. (1975) organspezifische Tumordiagnosen z.B. in bezug auf Brustkrebs, Magenkrebs und Dickdarmkrebs.
Die Verwendung von KCl-Extrakten als spezifische Tumorantigene konnte durch andere Testsysteme (LMI, DTH) bestätigt werden (Mc Coy et al. 1974).
Zusammenfassend kann man also sagen, daß für den MEM drei verschiedene Antigene in bezug auf Tumordiagnose eingesetzt werden können: EF und CaBP als unspezifische Antigene und KCl-Extrakte als spezifisches Antigen für eine organbezogene Tumordiagnose, auch wenn der Einsatz von KCl-Extrakten erst kürzlich unter Verwendung einer Weiterentwicklung des MEM bestätigt werden konnte (Douwes et al. 1978).

4) Klinische Anwendung des MEM-Test

Die von Caspary und Field gefundenen Resultate einer Lymphozytensensibilisierung von Malignompatienten gegenüber EF konnten in den folgenden Jahren von verschiedenen Gruppen bestätigt werden. 1972 berichteten Pritchard et al. über eine Untersuchung von 52 Malignompatienten und 27 Nicht-Malignompatienten. Alle Proben von Patienten mit gesicherten Tumoren zeigten eine positive Reaktion im MEM. Die Hemmung lag im all-

gemeinen über 13%, wohingegen in der Gruppe der Kontrollen alle Proben unter 3,5% Verlangsamung lagen.
Ähnliche Ergebnisse wurden 1973 von Goldstein, Kerr und Irvine publiziert.
Neben weiteren erfolgreichen Anwendungen (Meyer-Rienecker et al. 1974, Preece u. Light 1974, Klausch et al. 1975) wurden aber auch Publikationen veröffentlicht, die eine erfolgreiche Differenzierung von malignen und benignen Tumoren nicht bestätigen konnten (Lewkonia et al. 1974).
1975 erfuhr der Test dann eine erhebliche Erweiterung durch die Einführung von KCl-Extrakten durch Müller et al.. 1977 konnten sie durch zusätzliche KCl-Extrakte ihre organspezifische Tumordiagnose noch erweitern. Überraschenderweise konnten sie zeigen, daß alle Patienten mit einem Kolonkarzinom und CEA als Antigen im MEM positiv reagierten. Obwohl diese Ergebnisse bisher unbestätigt blieben, mag dies ein Hinweis darauf sein, daß CEA entgegen der bisherigen Meinung doch eine zellgebundene Immunreaktion auslösen kann.
In den Jahren 1976 - 1978 wurde der MEM mit sehr unterschiedlichen Erfolgen eingesetzt und erfolgreiche (Jenssen et al. 1976, Shaw et al. 1976, Rawlins et al. 1976, Bagshaw et al. 1977 Glaves et al. 1977, Günther et al. 1977) sowie nicht erfolgreiche (Arvilommi et al. 1977, Forrester et al. 1977, Rahi et al. 1976, Harlos et al. 1978) Anwendungen des MEM zur Tumordiagnose wurden publiziert.
Unabhängig von der erfolgreichen oder nicht erfolgreichen Anwendung des MEM bei der Diagnose von Krebs soll hier auf die Umstände hingewiesen werden, die zu einem falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnis führen können.
Schon sehr bald nach Veröffentlichung der ersten Ergebnisse stellte sich heraus, daß nicht nur Tumorpatienten im MEM positiv mit EF reagieren, sondern auch Personen mit anderen Erkrankungen: Influenza, Sarcoidosis, Crohn's Disease, Ulcerative Colitis, Myasthenia Gravis, Asthma,

alle neurologischen Erkrankungen, Masern, Lupus erythematodes und aktive Tuberkulose. Patienten in einem fortgeschrittenen Tumorstadium und Patienten mit einer Unfähigkeit auf PPD oder Thyroglobulin zu reagieren können zu falsch-negativen Ergebnissen führen (Field 1973).
Unter Berücksichtigung dieser Umstände konnte bei der erfolgreichen Anwendung des MEM im Durchschnitt eine Treffsicherheit von 85% erzielt werden.

5) Mechanismus des MEM

Die Entwicklung des MEM geht zurück auf den MMI (David 1964). Nachdem Bloom und Bennett (1966) und David (1966) zeigen konnten, daß ein löslicher Faktor (MIF) die Auswanderung der Makrophagen hemmt, und Hughes et al. (1970) eine gute Korrelation zwischen MMI und EMR nachweisen konnten, nahm man einen ähnlichen Mechanismus, wie er dem MMI zugrunde liegt, auch für den MEM an: Sensibilisierte Lymphozyten geben nach Antigenkontakt einen Faktor ins Medium ab, der dann die elektrophoretische Wanderung von Makrophagen beeinflußt.
1971 konnte Caspary zeigen, daß dabei tatsächlich eine Proteinsynthese stattfindet, denn die Reaktion konnte durch Zugabe von Puromycin gehemmt werden. Weitere Untersuchungen zum Mechanismus folgten 1972 ebenfalls von Caspary. Sie bestätigten die Hemmung der Reaktion sensibilisierter Lymphozyten mit PPD durch Puromycin. Außerdem konnte Caspary nachweisen, daß Lymphozyten der sensibilisierte Part innerhalb der Exudatzellen sind, indem er gereinigten Makrophagen und Antigen zunehmende Konzentrationen an Lymphozyten zusetzte und damit wieder eine Hemmung erzielte. In bezug auf den Nachweis eines löslichen Faktors gelang ihm ebenfalls ein wichtiger Schritt. Lymphozyten wären zwar am ersten Reaktionsschritt (Lymphozyten + Antigen) beteiligt, im zweiten (Makrophagenverlangsamung) reichte es jedoch aus, wenn er den Überstand von sensibilisierten Lymphozyten + Antigen mit den Makrophagen testete.

Es mußte also ein löslicher Faktor für die Reduktion der Wanderungsgeschwindigkeit verantwortlich sein.

Caspary konnte jedoch auch diesen zweiten Schritt durch die Zugabe von Puromycin hemmen. Es wurde daraus geschlossen, daß auch im Makrophagen eine aktive Proteinsynthese stattfinden muß, um die Verlangsamung manifest werden zu lassen.

1973 führten Pritchard et al. die sogenannte Split-Methode (Modified-MEM) ein. Sie inkubierten zunächst die Lymphozyten mit Antigen und behandelten dann die Makrophagen lediglich mit dem Überstand des Inkubationsgemisches. Sie erzielten damit dieselben Resultate wie mit der alten Methode und lieferten damit einem weiteren Beweis für das Vorhandensein eines löslichen Faktors. Zwei weitere wichtige Resultate wurden in dieser Arbeit beschrieben. Pritchard et al. konnten die Hemmung der Reaktion im ersten Schritt durch Puromycin oder Actinomycin D nicht bestätigen und standen damit im direkten Widerspruch zu Caspary (1972). Außerdem fanden sie keine Steigerung der Reaktion bei 37°C gegenüber 23°C. Es wurde daher eine aktive Proteinsynthese in Frage gestellt.

Auf der anderen Seite aber waren sie die Ersten, die das Molekulargewicht ihres Faktors bestimmen konnten. Durch Auftrennung der Lymphozytenüberstände von Tumorpatienten wurden zwei Faktoren nachgewiesen (MG 23.000 bzw. 8.000d), die eine Verlangsamung der Makrophagen hervorriefen, wobei die kleinere Substanz wesentlich aktiver war.

Carnegie konnte 1973 durch Verdünnung von MSF-haltigen Überständen zeigen, daß Makrophagen nur eine bestimmte Kapazität zur Aufnahme von MSF haben. Er schlug zwei Mechanismen für die Verlangsamung der Makrophagen vor:

1) MSF verändert die elektrische Ladung der Zelloberfläche
2) MSF verändert den elektrodynamischen Zustand der Zelle

1974 gelang es Preece und Light ebenfalls einen Faktor zu isolieren, der eine verlangsamende Wirkung auf Makro-

phagen hat. Nachdem Remold et al. (1972) gezeigt hatten, daß MIF auch durch ConA-Stimulation von nicht sensibilisierten Lymphozyten gewonnen werden kann, versuchten Preece und Light dieses Prinzip auch auf die Produktion von MSF zu übertragen. Zunächst untersuchten sie den Überstand sensibilisierter Lymphozyten von Tumorpatienten, wobei sie als Antigen TBP (Tumor Basic Protein) einsetzten. Tatsächlich konnten sie einen Faktor mit einem Molekulargewicht von 23.000d isolieren. Daraufhin inkubierten sie Lymphozyten von Kontrollpersonen mit ConA und fanden im Überstand ebenfalls einen Faktor, der die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit von Makrophagen herabsetzte. Dieser Faktor hatte ebenfalls ein Molekulargewicht von 23.000d. Zusätzlich stimmte dieses Molekulargewicht überraschend genau mit dem von Remold et al. (1972) für MIF (human) bestimmten überein.
Das oben angeführte Ergebnis von Pritchard konnten Preece und Light nicht bestätigen. Sie führten dies auf die Verwendung unterschiedlicher Antigene zurück.

Weiterhin konnten sie zeigen, daß MSF nicht artspezifisch wirkt, denn auch die Wanderungsgeschwindigkeit von Mäuse-Makrophagen und Lymphomazellen wurde herabgesetzt. Allerdings schwankten die Ergebnisse zu stark, um diese Zellen als Indikatorzellen einzusetzen.

1976 untersuchten Shaw et al., ob es sich bei der Triggerung von sensibilisierten Lymphozyten um eine allgemeine Wirkung von stark basischen Proteinen handelt. Diese Vermutung konnte jedoch nicht bestätigt werden, so daß man weiterhin eine Antigenerkennung zwischen den sensibiliserten Lymphozyten und EF annehmen durfte.
Eine weitere interessante Untersuchung in bezug auf den MSF machten Jenssen et al. (1976). Sie inkubierten Blutlymphozyten von BCG-sensibilisierten Meerschweinchen mit PPD und isolierten die Überstände nach unterschiedlicher Inkubationsdauer. Anschließend wurden die Überstände durch Säulenfraktionierung aufgetrennt und

die einzelnen Fraktionen auf ihre verlangsamende Wirkung von Makrophagen untersucht. Nach zweistündiger Inkubationszeit fanden sie die größte Aktivität im Bereich von 13.000d, nach 6-8 Stunden bei 40.000d und nach 24 Stunden bei über 100.000d.
1977 konnten Jenssen et al. diese Ergebnisse für Lymphozyten von Mäusen mit Methylcholanthrene-induzierten Tumoren und unter Verwendung von KCl-Extrakten als Antigen bestätigen.
Shenton et al. (1977) fanden in Lymphozytenüberständen von Multiple Sklerose Patienten nach Inkubation mit EF einen Faktor mit einem Molekulargewicht von 13.-15.000d.
Zusammenfassend muß man sagen, daß infolge unterschiedlicher Systeme und der Verwendung verschiedener Antigene in bezug auf den Mechanismus des MEM als auch auf den von Lymphozyten produzierten Faktor nur widersprüchliche oder nicht vergleichbare Ergebnisse vorliegen.
Tabelle I zeigt eine Zusammenfassung der von verschiedenen Arbeitsgruppen isolierten Faktoren.

Tabelle I: Übersicht der bisher im MEM und EMT verwendeten Systeme zur Induktion und Charakterisierung von MSF

	Species	Ag	Zielzelle	Inkubationszeit LytAg	Molekulargewicht MSF/EMSF
Pritchard et al. 1973	Human	HEF	Makrophagen	90 Minuten	8.000 und 20.000
Preece, Light 1974	Human	TBP Con A	Makrophagen Makrophagen	90-120 Minuten	23.000 23.000
Janssen et al. 1976	Meer-schweinchen	PPD	Makrophagen	1,2 Stunden 4-6 Stunden	13.000 13.000 35.000-60.000 160.000-190.000
				24 Stunden	35.000-60.000 160.000-190.000
Shenton et al. 1977	Human	HEF	Makrophagen TSRBC	90 Minuten 90 Minuten	13.000-15.000 13.000-15.000
Janssen et al. 1977	Maus	KCl-extrakt	Makrophagen TSRBC	1,2 Stunden 6 Stunden	13.000 13.000 35.000-60.000 160.000-190.000
				10 Stunden	35.000-60.000 160.000-190.000

E) Weiterentwicklung des MEM-Test zum Elektrophorese-Mobilitäts-Test

Field und Caspary benutzten in ihrer Versuchsanordnung Meerschweinchen-Makrophagen als Indikatorzellen. Diese Indikatorzellen stellten sich jedoch schon sehr bald als problematisch dar. Die Gewinnung von Peritoneal-Exudat-Makrophagen erfordert einen nicht unerheblichen Aufwand und eine gewisse Erfahrung und Training. Bei den durch Reizung mit Paraffinoel gewonnenen Zellen handelt es sich um inhomogene, d.h. in der Größe unterschiedliche Makrophagen-Populationen, die mit einer stark wechselnden Zahl von Oeltröpfchen beladen sind (Shenton et al. 1973) und mit 15-20% Granulozyten bzw. Lymphozyten vermischt sind. Es erfordert also eine grosse Übung die jeweils "richtigen" Indikatorzellen herauszusuchen. Ferner muß darauf geachtet werden, daß die Meerschweinchen-Makrophagen gesund sind und keine Spontanreaktivität gegenüber EF besitzen. Um eine MLC-ähnliche Reaktion gegenüber den humanen Lymphozyten zu vermeiden, müssen die Makrophagen zusätzlich vor dem Einsatz im MEM bestrahlt werden (Field u. Caspary 1970).

Um diesen Nachteil zu umgehen, versuchten Porzsolt et al. (1975) andere Indikatorzellen einzusetzen. Tatsächlich stellte sich heraus, daß tannierte und Sulfosalicylsäure stabilisierte Schafserythrozyten als Indikatorzellen eingesetzt werden können. Damit hatte man eine Indikatorzelle zur Hand, die in großen Mengen reproduzierbar hergestellt werden kann, und die eine große Homogenität in bezug auf Größe und Wanderungsverhalten im elektrischen Feld zeigte. Damit war eine wesentliche Erleichterung eingeführt, die es ermöglichte, den Test schneller zu erlernen als bisher und ihn auch wesentlich leichter anwenden zu können. Als Bezeichnung für den Test wurde nun gewählt: Elektrophorese-Mobilitäts-Test (EMT). Der von Field und Caspary angenommene MSF wird in der vorliegenden Ar-

beit als EMSF (Electrophoretic Mobility Slowing Factor) bezeichnet.

D) Elektrophorese-Mobilitäts-Test

1) Literaturübersicht

Nach der Einführung des EMT und dessen erfolgreicher Anwendung bei ersten klinischen Untersuchungen durch Porzsolt et al. (1975a,b) wurde die Verwendung von tannierten Erythrozyten als Indikatorzellen durch Jenssen et al. (1975) bestätigt. Sie konnten im direkten Vergleich von Makrophagen und TSRBC zeigen, daß Parameter wie Antigenmenge (PPD), Lymphozytenkonzentration und Produktion von MSF einander entsprachen.

1976 berichteten Douwes et al. über eine erfolgreiche Anwendung des EMT bei 150 untersuchten Personen. Während alle Gesunden im Mittel eine Beschleunigung der EIZ von 12,1% zeigten, lagen die Werte bei benignen Erkrankungen im Höchstfall bei 4,9%, die von Tumorpatienten hingegen bei 13,7% Verlangsamung.
1977 konnten Tautz et al., Nitschke et al., Lampert et al., und Douwes et al. den Einsatz der EIZ in weiteren klinischen Untersuchungsreihen ebenfalls bestätigen.

Eine weitere wichtige Arbeit wurde von Shenton et al. (1977) publiziert. Hierin verglichen sie ausführlich die verschiedenen Parameter des MEM und des TEEM. Sie konnten u.a. zeigen, daß die Dosisabhängigkeit der Reaktionen in bezug auf Lymphozyten- bzw. Antigenkonzentration einander entsprach. Außerdem konnten sie nachweisen, daß die TSRBC empfindlicher auf MSF reagieren als die Makrophagen. Zusammenfassend kamen sie zu dem Schluß, daß die TSRBC ein gleichwertiger Ersatz für die Makrophagen sind, der Test insgesamt jedoch wesentlich leichter in der Form des TEEM durchzuführen ist.
Dyson und Corbett konnten 1978 über eine erfolgreiche Differenzierung von Tumorpatienten und Kontrollen mit Hilfe des EMT berichten. Harlos und Weiss (1978) be-

stätigten in einem Vergleich von Makrophagen und FTSRBC (Fixed, tanned sheep red blood cells) die Schlußfolgerungen von Shenton et al..
Die Möglichkeit falsch-positiver oder falsch-negativer Resultate ist im EMT allerdings ebenfalls gegeben (z.B. durch Kreuzreaktionen anderer Krankheiten mit EF).

2) Mechanismus des EMT

Ausgehend von den Untersuchungen des MSF beim MEM und der Parallelität zwischen MEM und EMT (Shenton et al. 1977) könnte man für diese Testsysteme denselben Mechanismus annehmen. Es stellten sich jedoch schon sehr bald Unterschiede heraus. Während die Makrophagen-MSF Interaktion durch Puromycin gehemmt werden konnte (Caspary 1970), ist eine solche Hemmung mit EIZ als Indikatorzellen nicht möglich. Hier muß also ein passiver Vorgang vorliegen, der zu einer Verlangsamung der EIZ führt.
Porzsolt et al. (1975) zeigten außerdem, daß HEF einen nicht zu vernachlässigenden Einfluß auf die EIZ ausübt, indem es sie stark verlangsamt. Dieses Phänomen wird bei Makrophagen jedoch nicht beobachtet. HEF hat keinen Einfluß auf die Wanderungsgeschwingikeit von Makrophagen im elektrischen Feld.
In bezug auf die Produktion von EMSF konnten Porzsolt et al. (1975) ebenfalls eine Proteinsynthse nachweisen. Die Reaktion von Humanlymphozyten mit HEF konnte durch Puromycin gehemmt werden.
Die von Jenssen et al. (1977) gemachten Untersuchungen (s.o.) über den Einfluß der Inkubationszeit auf das Molekulargewicht des MSF konnten auf den EMT mit TSRBC als Indikatorzellen übertragen werden. Dies könnte eventuell auf eine Identität der beteiligten Faktoren im MEM und EMT hinweisen.
Der eigentliche Mechanismus des EMT als auch der EMSF sind jedoch bis heute umstritten. Da HEF eine starke Wirkung auf die EIZ hat, konnte bis heute nicht sicher

ausgeschlossen werden, daß der EMSF lediglich ein modifiziertes HEF ist. Lymphozyten von Tumorpatienten könnten z.B. das HEF anders abbauen als Lymphozyten von Gesunden. Damit würde man kein Lymphokin nachweisen, sondern lediglich "Reste" des HEF.
Es war außerdem bis heute nicht möglich, zu zeigen, daß die Verlangsamung der EIZ durch Überstände von mit HEF inkubierten Lymphozyten größer ist, als die Verlangsamung, die HEF allein auf den EIZ hervorrufen würde. Da jedoch signifikante Unterschiede in der Reaktion von Tumorpatienten und Kontrollen im EMT unter Verwendung von EIZ gemessen werden können, nahmen z.B. Dyson und Corbett (1978) an, daß es sich im Fall von HEF nicht um die Messung eines Lymphokins handelt, sondern um die Messung unterschiedlicher Abbauprodukte des HEF.

F) Ziele der vorliegenden Arbeit

Wie aus der Literaturübersicht hervorgeht, sind sowohl der MEM als auch der EMT bis heute in der Diskussion.

Ohne exakte Daten über die Funktionsweise eines Tests muß dessen klinische Anwendbarkeit zwangsläufig nur bedingt möglich sein. Da der EMT als ein Test zur Früherkennung von Krebs eingesetzt werden soll, ergeben sich gerade hieraus eine Reihe von Fragen: Wann tritt die Sensibilisierung zum ersten Mal auf? Gibt es eine Kinetik der Lymphozytensensibilisierung während der Entstehung und Manifestation eines Tumors? Wie verläuft die Sensibilisierung nach erfolgreicher Therapie des Tumors? Ist es möglich, Patienten nach erfolgreicher Operation durch eine besonders frühe Erkennung vor Metastasen zu schützen?

Neben dieser klinisch bezogenen Problematik stehen natürlich die Fragen nach dem Mechanismus des Tests: Handelt es sich wirklich um eine Antigenerkennung? Kommt es wirklich zur Ausschüttung eines Lymphokins, oder weisen wir nur "Reste" des HEF nach, wie es Dyson und Corbett vorgeschlagen haben. Ausgehend von den Untersuchungen von Remold et al.(1972) und Preece u. Light (1974) müßte es möglich sein, EMSF durch ConA zu induzieren. Diese Fragen lassen sich in einem Humansystem nur schwer beantworten. Eine Möglichkeit zur Beantwortung besteht in der Anwendung eines Tiermodells. Obwohl mehrere Gruppen unabhängig voneinander den Einsatz des MEM und EMT im Tiermodell beschrieben haben (Iwaguchi et al. 1974, Shelton et al. 1975, Pasternak et al. 1976, Kotzsch et al. 1976, Werner et al. 1978), ist bis heute lediglich bestätigt worden, daß MEM und EMT sich im Tiermodell untersuchen lassen.

Sinn dieser Arbeit ist es, anhand eines genau definierten Ratten-Tumormodells zu versuchen, die oben genannten Fragen, insbesondere nach dem Mechanismus des EMT, zu klären.

II) Material und Methoden

A) Ratten-Tumormodell

1) Fischer 344 Ratten

Für alle Versuche werden weibliche syngene Fischer 344 Ratten von Charles River Breeding Laboratories, Wilmington, Mass., USA, verwendet.
Die Herkunft dieser Albino-Ratten geht zurück auf Curtis (1920), Columbia University, Institute for Cancer Research. Über Heston (1949) gelangte der Stamm dann zum NIH, Bethesda, Maryland. Alle folgenden Zelllinien stammen dann entweder vom NIH oder von Dr. W.F. Dunning, Papanicolaou Research Institute, Miami, Florida.

Die mittlere Lebenserwartung der Fischer Ratten schwankt zwischen 25 und 31 Monaten bei Männchen und 23-29 Monaten bei Weibchen. Die mittlere Lebenserwartung von SPF-Weibchen wird mit 25 Monaten angegeben.

Über das Vorkommen spontaner Tumoren während der natürlichen Lebenserwartungszeit sind zahlreiche Untersuchungen erschienen: Sass et al. (1975), Jacobs u. Huseby (1967), Moloney et al. (1970), Davey u. Moloney (1970).
Für die vorliegende Arbeit wurden die Fischer 344 Ratten unter normalen Laborbedingungen gehalten. Sie bekamen Wasser und Futter ohne Einschränkung.

2) Tumor R3230AC

Der R3230AC Tumor der Fischer Ratten wurde 1974 durch Dr.Gary S.David von Dr.Arthur Bogden (Mason Research Institute, Worcester, Mass.) als Zellinie von den Behringwerken bezogen. Der im Labor von Dr.W.F. Dunning (Papanicolaou Research Institute, Miami, Florida) in Fischer Ratten spontan entstandene Tumor ist histologisch als Mamma-Adenokarzinom definiert. In bezug auf die Hormonbeeinflussung ist der Tumor autonom (wächst auch in Hormon-supprimierten Wirten), aber im Hinblick auf Insulin, Prolaktin und Estrogen Hormonempfindlich. Für diese Hormone sind Rezeptoren beschrie-

ben worden: Harmon et al. (1976), Smith et al. (1977), Wittliff et al. (1975).
Der Tumor ist in Fischer Ratten 100%ig transplantierbar. Eine Metastasierung wurde bis heute nur gelegentlich beschrieben.

3) Transplantation des Tumors

Zur Transplantation und Stammhaltung wird der Tumor subcutan (s.c.) gespritzt. Nach ca. 3-4 Wochen erreicht der Tumor bei einer ursprünglichen Injektion von 10^6 bis 10^7 Zellen eine Größe von 3-4cm und wird dann verpflanzt.

Die Ratten werden durch Chloroform getötet und der Tumor sofort unter sterilen Bedingungen entnommen. Mit Hilfe von Schere und Skalpell wird der Tumor zunächst freipräpariert, dann werden ca. 0,5 bis 1cm^2 große Stücke entnommen und in eine Petrischale mit PBS gelegt. Die Tumorstücke werden grob gewaschen und von nekrotischem Material befreit. Dann werden die Stücke mechanisch zerkleinert und in einem Trypsiniergefäß zunächst in PBS gewaschen (37°C Wasserbad, Magnetrührer). Der Überstand wird nach ca. 15 Minuten dekantiert und die Tumorstücke 2-3 mal für 15 Minuten in einer 0,25%igen Trypsinlösung (Stammlösung 20% Trypsin, Difco) trypsiniert. Die Überstände werden gesammelt und jeweils mit 1-2ml FKS (Serva) versetzt, um die Trypsinierung zu stoppen. Die so gewonnene Zellsuspension wird durch sterile Mullgaze filtriert und anschließend zentrifugiert (5 Minuten, 250g). Das Sediment wird zweimal in PBS gewaschen und die Zellen anschließend unter Tryphan Blau Zusatz gezählt (Neugebauer-Zählkammer).
Die Zellen werden dann nochmals zentrifugiert und das Sediment so aufgenommen, daß sich 1x10^7 Zellen/ml befinden. Mit Hilfe von Tuberkulinspritzen werden dann die gewünschten Zelldosen s.c. injiziert.

4) Tumorzellzüchtung in Zellkulturen

Die gewaschene und gezählte Tumorzellsuspension wird

auf $1x10^7$ Tumorzellen/ml eingestellt. Je nach Größe der Zellkulturflasche (Glas-bzw. Kunststofflaschen) werden $1x10^5$-$1x10^7$ Tumorzellen in 10-100ml Dulbecco + 10% FKS eingesäht und in einem Brutschrank inkubiert. Der Tumor wächst als konfluenter Zellrasen (Monolayer), der dem Wachstum von Epithelzellen ähnelt.
Nach zwei Tagen wird das Gewebekulturmedium dekantiert und durch neues ersetzt. Nach weiteren zwei Tagen oder früher (mikroskopische Kontrolle des Zellrasens) werden die Zellen nach Dekantieren des Mediums durch eine 0,25%ige Trypsinlösung abgelöst, zweimal gewaschen und auf neue Zellkulturflaschen umgesetzt.
Werden Zellen für Tierversuche benötigt, so werden diese nach dem Trypsinieren zweimal in PBS gewaschen und anschließend für drei Stunden in Dulbecco + 10% FKS inkubiert (Regeneration der Zellen). Danach werden die Zellen erneut in PBS gewaschen, nach dem Ausschlußverfahren mit Tryphan Blau gezählt und mit einer Tuberkulinspritze injiziert.

5) Einfrieren von Tumorzellen

Von den einzelnen Passagen des Tumors werden jeweils $1x10^7$-$5x10^7$ Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -196^oC aufbewahrt. Dazu wird die trypsinierte und gewaschene Tumorzellsuspension in Dulbecco + 10% FKS mit 10% DMSO versetzt und auf $2x10^6$ Tumorzellen/ml eingestellt. Die Tumorzellen werden dann zu 1ml-Portionen eingefroren (Glasampullen mit Schraubverschluß). Zum raschen Auftauen werden die Ampullen direkt in ein 37^oC Wasserbad gelegt. Die Zellen werden in einem Zentrifugenröhrchen abzentrifugiert und dann vorsichtig mit frischem Medium aufgenommen.

6) Optimierung der Metastasierung

a) Amputation des Tumors

Die Ratten werden zunächst mit Nembutal (3mg/100g Ratte, intraperitoneal) betäubt. Während der Amputation wird die Narkose durch Äther verstärkt bzw. kon-

trolliert. Mit sterilem Besteck wird dann das Bein oberhalb des Kniegelenks (der Poplietallymphknoten muß in jedem Fall mit entfernt werden) amputiert. Die Wundstelle wird mit Penicillinpuder bestäubt und die Wunde mit Hilfe der zu Anfang zurückgeschobenen Haut zugeklammert. Die Tiere erwachen ca. 2-4 Stunden nach der Operation.

b) Untersuchung der Metastasierung, Vorversuch

Um festzustellen, ob der Tumor hämatogen und/oder lymphogen metastasiert, werden $1x10^6$ Tumorzellen in die Fußsohle injiziert, und der Fuß bei einer Tumorgröße von ca. 1000 im Odi-Test (Odi-Test 20 R F/T, H.C. Kroeplin GmbH, D-6490 Schluechtern 1) amputiert. In den folgenden Wochen werden die Ratten äußerlich auf Rezidive untersucht. Sofort nach Todeseintritt, spätestens jedoch sechs Wochen nach der Amputation des Tumors, werden die Ratten seziert und makroskopisch auf Metastasen untersucht.

c) Wachstumskurven nach intraplantarer Injektion der Tumorzellen

Zur Bestimmung der Parameter, bei denen eine Metastasierung möglichst sicher verhindert wird bzw. gerade eine 100%ige Metastasierung stattfindet, werden zunächst Wachstumskurven erstellt. Dazu werden $1x10^5$ $-1x10^7$ Tumorzellen intraplantar injiziert und die Tumorgröße indirekt durch Messung der Fußdicke im Odi-Test bestimmt.

d) Bestimmung der Parameter für die Metastasierung des Tumors.

Nach Abschluß dieser Untersuchungen werden $6x10^5$ Tumorzellen intraplantar injiziert und die Ratten bei einer Fußdicke von 600, 700, 800, 900, und 1000 im Odi-Test amputiert. Pro Fußdicke werden 10 Ratten eingesetzt. Nach der Amputation werden die Ratten äußerlich auf Rezidive untersucht, wöchentlich gewogen und

auf äußerlich ertastbare Metastasen der Bauchhöhle untersucht.
In den unteren Amputationsgruppen (Fußdicke 600 und 700 im Odi-Test) wird ein Langzeitversuch parallel mitgeführt. Die Ratten bleiben bis zu einem Jahr nach der Amputation unter Beobachtung.
In dem Hauptversuch zur Optimierung der Metastasierung werden Ratten, die nach vier Monaten noch keine äußerlichen Anzeichen einer Metastasierung oder Schwächung des Allgemeinzustandes zeigen, getötet und makroskopisch untersucht.

e) Sektionsprotokoll

Nach Todeseintritt werden die Ratten nach einem Sektionsprotokoll untersucht. Dabei werden folgende Parameter festgehalten: Rezidivbildung, Milzgewicht, Gesamtgewicht, sowie eine genaue Übersicht der Metastasierung in Lunge, Leber, Niere, Ovar und para-aortische Lymphknoten.
Da sich die Metastasierung hauptsächlich auf die Lunge erstreckt, werden zusätzlich die Metastasenzahl sowie das Lungengewicht bestimmt.

B) Elektrophorese-Mobilitäts-Test (EMT)

1) Isolierung der Lymphozyten

a) aus dem Blut

Zum Entbluten der Ratten werden diese in einem Äthertopf stark betäubt. Anschließend wird die Halsregion mit Alkohol abgerieben und die Halsschlagader mit Hilfe eines Einmal-Skalpells eröffnet. Das Blut wird in einer Petrischale mit 1ml Heparin aufgefangen und 1:2 mit Hanks'-Lösung verdünnt. Zum Isolieren der Lymphozyten wird ein Ficoll-Doppelgradient (Ficoll-Isopaque, Deutsche Pharmacia GmbH, Freiburg) benützt (nach English und Andersen, 1974). Dazu werden 10ml Ficoll I (spezifische Dichte: 1,119) mit 10ml Ficoll II (spezifische Dichte: 1,077) überschichtet. Dieser Doppel-

gradient wird dann widerum mit dem Blut vorsichtig überschichtet.und 20 Minuten bei 800g zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren lassen sich die Lymphozyten aus der Grenzschicht zwischen Plasma und Ficoll I absaugen. Sie werden anschließend dreimal in Hanks' gewaschen und in einer Zählkammer gezählt.

b) aus der Milz

Die Milz wird steril entnommen und mit der Schere mechanisch zerkleinert. Die einzelnen Milzstücke werden dann in einem Glashomogenisator (Grinder, Tissue, Tenbroek, Bellco, Vineland N.J., clearance 0,04-0,06 inch) aufgearbeitet und die erhaltene Suspension durch eine sterile Mullgaze in ein Zentrifugenröhrchen umgefüllt. Die Zellen werden abzentrifugiert, einmal in PBS gewaschen und anschließend ebenfalls über einen Ficoll-Doppelgradienten geschichtet.
Zur Entfernung der Erythrozyten wird die Milzzellsuspension lediglich über Ficoll I geschichtet.
Die so erhaltenen Zellsuspensionen werden entweder direkt im EMT getestet, oder aber zweimal für je eine Stunde auf Plastikpetrischalen gegeben, um so die adhärenten Zellen zu entfernen und damit ihren Einfluß auf den EMT zu studieren. Die Zellen werden dabei in Gewebekulturmedium (Dulbecco + 10% FKS) aufgenommen und während der Inkubation in einem begasten Brutschrank gestellt (37°C). Nach zweimaligem Umsetzen der Zellsuspension in neue Petrischalen wird der Überstand vorsichtig abgenommen und die Petrischale leicht mit Hanks' nachgewaschen. Die Zellzahl wird anschliessend in einer Zählkammer bestimmt.

c) aus den Lymphknoten

Es werden in der Hauptsache Mesenteriallymphknoten steril mit Hilfe zweier Pinzetten entnommen und in einem Glashomogenisator aufgearbeitet. Die so erhaltene Zellsuspension wird durch eine sterile Mullgaze in ein Zentrifugenröhrchen umgefüllt und zentrifugiert. Anschließend werden die Zellen zweimal in Hanks' gewaschen und dann in einer Zählkammer gezählt.

2) Antigene

a) Herstellung von HEF und REF

Ratten EF wurde wie HEF nach der Methode von Caspary und Field (1971) hergestellt. Diese Aufarbeitung besteht im wesentlichen aus drei Schritten: Chloroform/Methanol-Extraktion zum Entfetten, Extraktion der basischen Proteine mit HCl sowie Fällung der Proteine mit Ammoniumsulfat. Im Einzelnen werden folgende Schritte ausgeführt:

- Waschen der Gehirnmasse in kalter NaCl-Lsg.(0,9%)
- Homogenisieren mit Ultra Thorax bei 4°C
- Erneutes Waschen in kalter NaCl-Lsg.
- Zentrifugieren, 10 Minuten, 1600g
- Suspendieren in 10fachem Volumen Aqua dest.
- Gefriertrocknung
- Rückstand mit 10fachem Volumen einer Chloroform/Methanol (2:1) Mischung zweimal je 30 Minuten extrahieren (Magnetrührer)
- Waschen mit Aqua dest. bis kein Chloroform mehr wahrgenommen werden kann
- Rückstand zentrifugieren, 10 Minuten, 600g
- Sediment mit 10fachem Volumen einer 5%igen NaCl-Lsg. 2-4 Stunden rühren, abzentrifugieren und lufttrocknen
- Rückstand mit n/50 HCl (10faches Volumen) über drei Stunden bei Zimmertemperatur extrahieren, alle 30 Minuten HCl erneuern und die Überstände jeweils getrennt sammeln, pH-Messung
- Überstände mit einem pH 3,5 und kleiner werden gepoolt, die übrigen verworfen
- Extrakte auf 4°C kühlen
- Proteine mit 40%iger Ammoniumsulfatlösung unter langsamen Zugeben bei 4°C fällen.
- Präzipitat 10-15 Minuten bei 600g zentrifugieren, 4°C
- Sediment in wenig Aqua dest. aufnehmen und gegen Aqua dest. dialysieren bis kein Ammoniumsulfat mehr nachgewiesen werden kann (Bariumchlorid-Fällung)
- Dialysiertes Material zentrifugieren, 10 Minuten, 1600 g

- Gefriertrocknung
- Proteinbestimmung nach Lowry

b) Herstellung von KCl-Extrakten aus dem Primärtumor sowie aus Nieren gesunder Ratten

Die KCl-Extrakte werden nach einer Methode von Mc Coy et al. (1974) unter leichter Modifikation hergestellt. Primärtumore werden steril entnommen, gewaschen und mit einer Schere zerkleinert, wobei nekrotisches Material vorsichtig entfernt wird. Die Nieren werden ebenfalls steril entnommen, von der Capsula fibrosa befreit und mechanisch zerkleinert. Alle weiteren Schritte verlaufen dann parallel:

- Homogenisieren in RPMI 1640 mit Ultra Thorax
- Zentrifugieren, 10 Minuten, 200g
- Überstand verwerfen
- Sediment mit 5fachem Volumen einer 3 M KCl-Lösung versetzen und 16-20 Stunden bei 4°C rühren
- Zentrifugieren, 1 Stunde, 40.000g
- Überstand über Nacht in 10fachem Volumen PBS dialysieren
- Zentrifugieren, 15 Minuten, 40.000g
- 10fach Konzentrierung des Überstandes mit Amicon UM-10 Membran
- Abfüllung zu je 1ml-Portionen und Gefriertrocknung
- Proteinbestimmung nach Lowry

c) Beckmann EAE-Peptid

EAE-Peptid = Experimental Allergic Encephalomyelitis Peptide (human) ist ein synthetisches Peptid, das die Aminosäurereste 114-122 innerhalb des enzephalitogenen Proteins umfaßt:

H_2N-Phe-Ser-Trp-Gly-Ala-Glu-Gly-Gln-Arg-COOH

Es hat ein Molekulargewicht von 1037 und ist biologisch aktiv in bezug auf Erzeugung einer EAE in Meerschweinchen. (Beckmann Instruments Int.SA, Technical Center, Bioproducts Dept., Geneva, Switzerland)

3) Inkubation der Lymphozyten mit dem Antigen

Nach der Zellzählung wird diejenige Zellsuspensionsmenge entnommen, die $7x10^6$ Lymphozyten enthält, in ein 10ml Glaszentrifugenröhrchen gefüllt und abzentrifugiert. Das Sediment wird dann in 3ml Antigenlösung aufgenommen. Diese besteht aus RPMI 1640 und im allgemeinen folgenden Antigenkonzentrationen: 33µg HEF/ml, 33µg REF/ml, 25µg EAE-Peptid/ml, 50µg KCl-Extrakt/ml. Der Probenansatz wird dann für 18 Stunden im 37°C Brutschrank (CO_2-begast) inkubiert. Danach werden die Lymphozyten abzentrifugiert (5Minuten, 250g) und der Überstand in ein Plastikröhrchen umgefüllt. Sollen die Überstände nicht sofort gemessen werden, kann man sie bei -20°C einfrieren.

4) Inkubation der Lymphozytenüberstände mit EIZ

Als Indikatorzellen dienen tannierte und Sulfosalicylsäure stabilisierte Schafserythrozyten (EIZ, Behringwerke AG). Die in lyophilisierter Form vorliegenden EIZ werden in einem Milliliter Aqua dest. rekonstituiert. Je nach Anzahl der zu messenden Proben werden 0,2-1ml entnommen, in ein 50ml Zentrifugenröhrchen gefüllt und mit Hanks' zweimal gewaschen. Anschließend werden die EIZ in einer Zählkammer gezählt und so eingestellt, daß sich $5x10^7$ EIZ/ml Hanks' befinden. 3ml Lymphozytenüberstand werden dann mit 1ml EIZ-Suspension (= $5x10^7$) bei Zimmertemperatur für 90 Minuten inkubiert und anschließend in die Elektrophoresekammer eingefüllt.

5) O-Werte

Als O-Werte bzw. O-Standards werden eingesetzt:
- 1ml EIZ (=$5x10^7$) + 3ml RPMI 1640 ohne weiteren Zusatz
- 1ml EIZ (=$5x10^7$) + 3ml Lymphozytenüberstand ohne Antigenzusatz
- 1ml EIZ (=$5x10^7$) + 3ml Antigenlösung

Es muß streng darauf geachtet werden, daß zu jedem Ansatz ein O-Wert mitgeführt wird, also auch bei zwei

getrennten Ansätzen an einem Tag. Die O-Werte werden ebenfalls 18 Stunden inkubiert. Beim Einfrieren der Überstände wird stets ein O-Wert mit eingefroren.

Abbildung 1 zeigt eine schematische Übersicht des EMT.

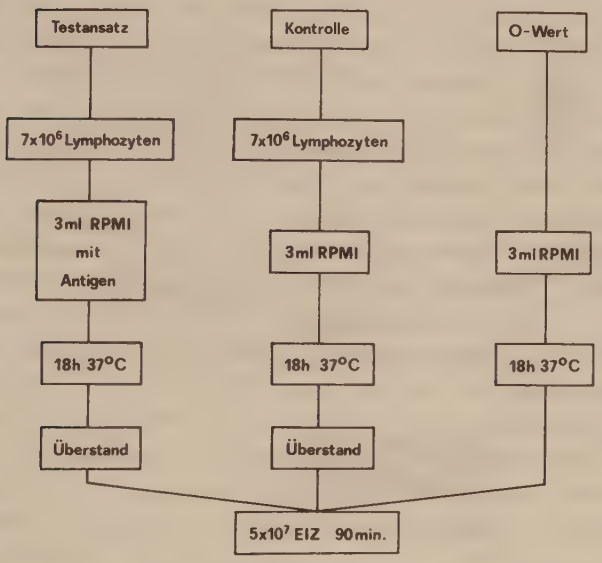

Abb. 1: Schema des Elektrophorese-Mobilitäts-Test

6) Das Zytopherometer

Das Zytopherometer ist ein Mikroskop zur Bestimmung der elektrischen Oberflächenladung (gemessenes Äquivalent ist das Zetapotential) suspendierter Teilchen aufgrund ihrer Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld. Abbildung 2 zeigt eine schematische Darstellung des Zytopherometers.

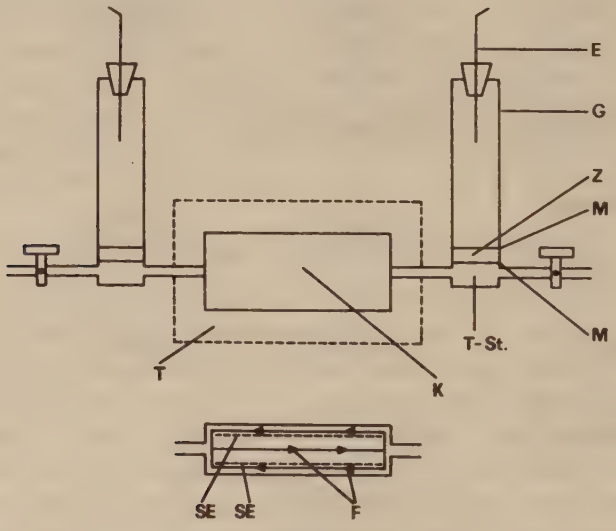

Abb. 2: Schematische Darstellung des Zytopherometers

Die zu untersuchende Suspension befindet sich in einer Kammer (K) mit rechteckigem Querschnitt, an deren Enden nicht polarisierbare Elektroden (E) sitzen. Die optische Achse des Mikroskops ist horizontal angeordnet, da die Meßkammer senkrecht stehen muß. Es werden dadurch Gravitationseinflüsse ausgeschaltet, die die Messung der Wanderungsgeschwindigkeit verfälschen könnten. Die Meßkammer befindet sich im Innern einer mit dem Umlaufthermostaten verbundenen Temperierkammer (T). Die Meßkammer steht beiderseits über T-Stücke (T-St) mit den Elektroden in Verbindung. Das Elektrodensystem besteht

aus dem Elektrodengefäß (G), dem Zwischenstück (Z) und dem T-Stück. Das Zwischenstück ist durch Membranen (M) von dem T-Stück einerseits sowie dem Elektrodengefäß andererseits abgetrennt. Hat man das Zytopherometer soweit aufgebaut, muß man zunächst die Zentrierung überprüfen, da Objektiv und Temperierkammer stets gut zueinander eingestellt sein müssen. Dazu befindet sich auf der Temperierkammer ein Justierkreis, mit dessen Hilfe man die Justierung leicht überprüfen und gegebenenfalls korrigieren kann.
Wie bereits in der Einleitung erwähnt, kommt es bei der rechteckigen Kammer zur Ausbildung von zwei sogenannten stationären Ebenen (SE), in denen die Messung der Partikel durchgeführt werden kann, ohne daß die Teilchen durch die elektroosmotische Flüssigkeitsströmung (F) beeinflußt werden. Die stationäre Ebene sollte nach Möglichkeit täglich überprüft werden. Dazu stellt man das Objektiv auf die vordere Kammerwand ein und kann nun mit dem Feintrieb das Objektiv zur Kammer hinfahren,wobei man an der Meßtrommel direkt in 1/1000mm die Tiefe der Kammer ablesen kann. Die Entfernung der vorderen stationären Ebene von der Kammerwand muß für jede Kammer nur einmal errechnet werden. Diesen Wert kann man dann auf der Meßtrommel vorgeben.
Die Beweglichkeit der EIZ wird in einem Modell des Zeiss-Zytopherometers (Carl Zeiss, Oberkochen) gemessen, das mit Platinelektroden bestückt ist. Die Elektrodengefäße werden dabei mit Hanks' gefüllt. Gemessen wird bei einer konstanten Stromstärke von 8mA (100-110V) und einer Kammertemperatur von 23°C.

7) Fernsehübertragungsanlage

Die Messung der EIZ erfolgt normalerweise durch ein Binokulartubus mit eingelassenem Netzmikrometer. In den vorliegenden Untersuchungen wurde eine Videoübertragungsanlage (Siemens) benutzt. Dabei wird das

mikroskopische Bild sowie das Netzmikrometer von einer FS-Kamera auf einen neben dem Zytopherometer stehenden Monitor (43cm ø) übertragen, auf dem man nun die Wanderung der EIZ sehr gut beobachten kann.

8) Bestimmung der Wanderungshemmung

a) Stoppuhr

Zur Messung der Wanderungsgeschwindigkeit der EIZ wird eine mechanische Stoppuhr mit Schleppzeiger verwendet. Diese ermöglicht es, gleichzeitig zwei Zeiten zu stoppen und hinterher getrennt abzulesen. Nach Anlegen des Stroms sucht man sich eine Zelle heraus, die sich in der stationären Ebene befindet. Hat diese einen Teilstrich des Netzes erreicht, wird die Stoppuhr gestartet. Beim Erreichen des nächsten Teilstriches wird die erste Zeit gestoppt und gleichzeitig der Strom umgepolt. Der zweite Zeiger der Stoppuhr läuft dabei weiter. Hat die Zelle auf dem Rückweg den Ausgangsstrich wieder erreicht, wird auch der zweite Zeiger gestoppt. Auf der Stoppuhr kann man nun die Wanderungszeit für den Hinweg (erster Zeiger) und die für den Hin- und Rückweg (zweiter Zeiger) ablesen.

b) Bestimmung der tatsächlichen mittleren Wanderungsgeschwindigkeit

Durch die Messung von Hin- und Rückweg können Einflüsse von Strömungsgeschwindigkeiten ausgeschlossen werden. Wir messen also zwei Geschwindigkeiten: V_1 für den Hinweg und V_2 für den Rückweg. Es ergibt sich also die Formel: $V_1 + V_2 = 2V$ I)
Da die Stromstärke konstant ist, ergibt sich für die Geschwindigkeit $v = \frac{s}{t}$. Da die Wegstrecke aber eine Konstante ist, kann man für s=1 setzen. Es ergibt sich damit $v = \frac{1}{t}$.
Setzt man dies in Formel I) ein und löst diese nach t auf, so ergibt sich:

$$t = \frac{2 \cdot t_1 \cdot t_2}{t_1 + t_2}$$

Setzt man nun für $t_1 = a$ und für $t_2 = b-a$, so ergibt sich:

$$t = \frac{2a(b-a)}{b} = \text{tatsächliche Wanderungszeit}$$

Nach dieser Formel werden die tatsächlichen Wanderungszeiten von etwa 10-15 Zellen berechnet und von diesen dann Mittelwert und Standardabweichung gebildet.

c) Formel zur Berechnung der Wanderungshemmung

Aus den Mittelwerten von Probe und O-Wert errechnet sich die Verlangsamung der Indikatorzellen nach der Formel:

$$\frac{M2 - M1}{M1} \times 100 = \% \text{ Verlangsamung}$$

M2 = Mittelwert der Probe
M1 = Mittelwert des O-Werts

Für den Fall M2 > M1 nehmen alle Werte ein positives Vorzeichen an. Dies entspricht dann einer relativen Hemmung. Ist die Probe schneller als der O-Wert, nehmen alle Werte ein negatives Vorzeichen an. In diesem Fall spricht man von einer relativen Beschleunigung gegenüber dem O-Wert.

d) Statistik

Das erzielte Ergebnis wird mit Hilfe des Student t-Test auf Signifikanz geprüft.
Die in den Abbildungen dargestellten Ergebnisse stellen Mittelwerte typischer Versuchsreihen dar.
Tatsächliche Wanderungszeiten mit einer größeren Standardabweichung als 5% werden verworfen und sind in den Ergebnissen nicht berücksichtigt.
Signifikante Verlangsamungen der EIZ von mehr als 5% gegenüber dem O-Wert werden als positiv im Sinne einer Tumordiagnose angesehen.

C) Mechanismus des EMT

1) Wiederholte Stimulation von Lymphozyten mit HEF

Um zu sehen, ob Lymphozyten von Tumorratten bei wiederholter Stimulation in der Lage sind, EMSF mehrmals abzugeben, wird folgender Versuchsansatz durchgeführt: $7x10^6$ Lymphozyten von Tumorratten werden mit der Antigenlösung (RPMI 1640 + 33µg HEF/ml) für 60 Minuten inkubiert. Anschließend werden die Lymphozyten abzentrifugiert und der Überstand für spätere Messungen eingefroren. Die Lymphozyten werden einmal in Hanks' gewaschen und dann erneut für 4-18 Stunden mit der Antigenlösung inkubiert. Danach werden die Lymphozyten abzentrifugiert und die Überstände ebenfalls eingefroren.

2) Produktion von EMSF nach Wegnahme des Antigens

$7x10^6$ Lymphozyten von Tumorratten werden für 1-5 Minuten mit der Antigenlösung (RPMI 1640 + 33µg HEF/ml) inkubiert. Anschließend wird der Lymphozytenüberstand gewonnen, die Lymphozyten zweimal in Hanks' gewaschen und dann für weitere 18 Stunden ohne Antigen inkubiert (RPMI 1640 ohne Zusatz).

3) Absorption von EMSF durch EIZ

Um zu prüfen, ob sich EMSF durch EIZ absorbieren läßt, und damit eine Information über die Aufnahmekapazität der EIZ in bezug auf EMSF zu erhalten, wird EMSF-haltiger Überstand für 90 Minuten mit $5x10^7$ EIZ inkubiert. Dann werden die EIZ abzentrifugiert und der Überstand erneut mit $5x10^7$ EIZ versetzt. Die abzentrifugierten EIZ werden zur Messung mit frischem RPMI aufgenommen. Dieser Vorgang wird insgesamt dreimal durchgeführt. Gleichzeitig sollte untersucht werden, ob der EMSF von den EIZ wieder heruntergewaschen werden kann. Dazu wird ein EMSF-haltiger Überstand mit $5x10^7$ EIZ inkubiert.

Nach 90 Minuten werden die EIZ abzentrifugiert, in frischem Medium aufgenommen und gegen einen O-Wert gemessen. In einem Parallelansatz werden die abzentrifugierten EIZ zweimal in RPMI 1640 gewaschen und dann gegenüber einem O-Wert gemessen. Zum Nachweis des abgewaschenen EMSF wird die Waschflüssigkeit mit frischen EIZ versetzt und diese gegen einen O-Wert gemessen.

4) Verbleib des Antigens nach Inkubation mit Lymphozyten von Tumorratten und Kontrollen

Um etwas über den Verbleib des Antigens zu erfahren, wird versucht, Überstände von sensibilisierten Lymphozyten und Kontrollen, die mit HEF inkubiert worden sind, erneut mit frischen Lymphozyten von Tumorratten und Kontrollen zu inkubieren. Folgende Ansätze werden durchgeführt:

Lymphozytenüberstand-TR + Lymphozyten von Tumorratten
Lymphozytenübertsand-TR + Lymphozyten von Kontrollen
Lymphozytenüberstand-NR + Lymphozyten von Tumorratten
Lymphozytenüberstand-NR + Lymphozyten von Kontrollen

5) Behandlung der Lymphozyten mit Mitomycin und Puromycin

Mit Hilfe von Mitomycin soll die DNA-Synthese blockiert werden. Die Lymphozyten werden in Dulbecco + 10% FKS aufgenommen und mit Mitomycin (Serva) für 60 Minuten inkubiert ($1x10^7$ Lymphozyten/ml/25µg Mitomycin).
Nach der Inkubation werden die Lymphozyten dreimal in Hanks' gewaschen und dann für 18 Stunden mit der Antigenlösung inkubiert ($7x10^6$ Lymphozyten + 3ml Antigenlösung). Um einen toxischen Effekt auszuschliessen, werden die Lymphozyten vor der Inkubation mit Tryphan Blau gezählt.
Mit Hilfe von Puromycin soll die Eiweißsynthese blockiert werden. Einem normalen Ansatz von $7x10^6$ Lymphozyten + Antigenlösung (RPMI 1640 + 33µgHEF/ml) werden - entweder 30 Minuten vor Antigenzugabe oder

30 Minuten nach Antigenzugabe- 20µg Puromycin/ml (Serva) zugesetzt und der Ansatz für 2 Stunden inkubiert.
Um einen Einfluß des Puromycins auf die EIZ auszuschließen, wird einem zusätzlichen O-Wert ebenfalls Puromycin zugesetzt.

D) Fraktionierung, Reinigung und Identifizierung der Antigene

1) Amicon Membran-Filtration

Für eine grobe Fraktionierung des HEF-Extraktes wird die Auftrennung durch Amicon Membranen verwendet. 20-50ml einer filtrierten HEF-Lösung (30-100µg HEF/ml Hanks') werden in einer magnetisch geführten Amicon Ultrafiltrationszelle bei 4°C und bei einem Druck von max. 2 Atü durch folgende Membranen aufgetrennt:

Diaflo Ultrafiltrationsmembran	Trenngrenze MG
UM-2	1.000
UM-10	10.000
PM-30	30.000
XM-50	50.000
XM-300	300.000

Die Membranen sind mit Glycerin behandelt, um ein Austrocknen zu verhindern. Vor Gebrauch werden sie daher mindestens 15 Minuten in Aqua dest. gelegt und erst dann in die Zelle eingesetzt.
Nach der Filtration wird das Filtrat durch Millex^{R}-Einweg-Filtereinheiten steril filtriert (Millipore, S.A., France, 0,45µ)
Die so erhaltenen Fraktionen werden dann in steigenden Konzentrationen mit Lymphozyten von Kontrollen und Tumorratten inkubiert und die Überstände durch Zugabe von $5x10^7$ EIZ auf ihren EMSF-Gehalt überprüft. Zusätzlich werden die einzelnen Fraktionen direkt mit $5x10^7$ EIZ inkubiert und im Zytopherometer gemessen.
Eine Anreicherung des Antigens erfolgt durch Gefrier-

trocknung derjenigen Fraktion, in der das Antigen zum ersten Mal erscheint. Das Lyophilisat wird in 2ml Hanks' rekonstituiert und über eine Sephadex G-50 Säule aufgetrennt.

2) Säulenchromatographie

Die chromatographischen Auftrennungen erfolgen sowohl nach dem Prinzip der Molekularsiebchromatographie als auch der Ionenaustauscherchromatographie.
Für die Molekularsiebchromatographie werden verwendet:
Sephadex G-50 (Auftrennungsgrenze 1.500 - 30.000d)
Sephadex G-100 (Auftrennungsgrenze 4.000 - 150.000d)
Sephadex G-150 (Auftrennungsgrenze 5.000 - 400.000d)
(Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden)
Alle Auftrennungen werden in folgendem Puffer durchgeführt: 0,1 M Tris/HCl, 1 M NaCl, pH 8,0
Für die Ionenaustauscherchromatographie werden der Anionenaustauscher QAE-Sephadex A-25 sowie der Kationenaustauscher SP-Sephadex C-25 verwendet (Pharmacia Fine Chemicals).

Puffer für den Anionenaustauscher: 0,05 M Tris/HCl pH 7,2
Nachwaschen : 2 M NaCl pH 5
Puffer für den Kationenaustauscher: 0,05 M Tris/HCl pH 7
Gradient: 0,1 - 1 M NaCl pH 7
Nacheluat: 0,05 M Tris/NaOH 1 M NaCl pH 11

Die Chromatographien werden bei 4°C durchgeführt, Das Eluat wird mit Hilfe eines LKB-Fraktionssammlers aufgefangen und der Proteingehalt mit Hilfe eines UV-Spektrometers als % Transmission bei 280nm von einem Schreiber aufgezeichnet.
Das Eluat wird bei allen Versuchen in 5ml-Fraktionen gesammelt.

Die erhaltenen Fraktionen werden mindestens 24 Stunden bei 4°C gegen PBS (100faches Volumen) dialysiert. Anschließend werden alle Fraktionen auf pH 7,2 eingestellt und mit Hilfe von Millex^{R}-Filtern sterilfiltriert. Steigende Mengen der einzelnen Fraktionen werden dann mit $7x10^{6}$ Lymphozyten von Tumorratten und Kontrollen für 18 Stunden bei 37°C inkubiert und die Überstände mit $5x10^{7}$ EIZ inkubiert und im Zytopherometer gemessen. Zusätzlich werden $5x10^{7}$ EIZ direkt mit den einzelnen Fraktionen getestet. Zur Anreicherung des Antigens werden diejenigen Fraktionen, die nach Inkubation mit Lymphozyten von Tumorratten eine Verlangsamung der EIZ hervorrufen, nicht aber nach Inkubation mit Lymphozyten von Kontrollen, gefriergetrocknet und anschließend in wenig Hanks' rekonstituiert.

3) SDS-Polyacrylamid-Diskelektrophorese

Das Polyacrylamidgel wird hergestellt aus Acrylamid $CH_2=CH-CONH_2$ (Ac) und N-N'-Methylenbisacrylamid (MbAc)

$$CH_2=CH-CONH$$
$$\qquad\qquad CH_2$$
$$CH_2=CH-CONH$$

durch Vernetzen der beiden Substanzen mittels Katalysatoren. Es entstehen Ketten aus Ac-Molekülen, die durch MbAc quervernetzt werden. Das Molverhältnis liegt etwa bei 60 Mol Ac und 0,7-1,0 Mol MbAc.
Als Katalysatoren werden eingesetzt: Ammoniumperoxydisulfat (AP) und N,N,N',N',Tetramethyläthylendiamin (TEMED).
Durch die SDS-Behandlung bekommen alle Proteine eine negative Ladung und wandern daher zur Anode. Während der Wanderung werden sie durch das Gel nach Größe aufgetrennt.
Im Einzelnen werden folgende Lösungen benötigt:

Gelpuffer: 7,8g NaH_2PO_4
26,6g $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$ ad 1 Liter mit A.dest.
2,0g SDS (Merck) pH 7,2

Ansatz für das Trenngel: 15ml Gelpuffer
10ml Ac + MbAc 13,2%ig (Serva)
0,45ml TEMED 2%ig (Serva)
1,5ml AP 1,5%ig (Serva)

Ein Sammelgel wird nicht verwendet, da sich hierdurch in diesen Versuchen keine Vorteile ergeben.
Der Elektrodenpuffer besteht aus 1:2 verdünntem Gelpuffer.
Es können 5 bis max. 400µl der Probe aufgetragen werden.
Die Röhrchen laufen über Nacht 6-7 Stunden bei einer Stromstärke von 8mA/Röhrchen. Vor dem Auftragen werden die Proben eine Minute in einer SDS/Sucrose-Lösung (0,2%SDS, 30% Sucrose) gekocht.
Die Anfärbung erfolgt unter leichter Schaukelbewegung in einer filtrierten Lösung von 0,1%igem Amidoschwarz (Merck) in Methanol-Eisessig-H_2O (9:1:10) über 30 Minuten. Die Entfärbung erfolgt in mehreren Bädern derselben Zusammensetzung, jedoch ohne den Proteinfarbstoff.

4) Bestimmung des Molekulargewichts

Zur Bestimmung des Molekulargewichts der einzelnen Fraktionen bzw. der gereinigten Antigene werden die Sephadex G-100, G-50 und G-150 mit Markerproteinen geeicht: Bovine Serum Albumin (MG 68.000), Chymotrypsin (MG 24.500) und Lysozym (MG 14.500).
Anschließend wird mit Hilfe von halblogarithmischem Papier eine Eichkurve erstellt, aus der sich dann das Molekulargewicht jeder beliebigen Fraktion ablesen läßt.
Bei der SDS-PAGE werden ebenfalls die oben genannten Proteine als Marker eingesetzt.

E) Isolierung und Charakterisierung von EMSF

1) Kinetik der EMSF-Produktion bei Tumorratten

Jeweils $7x10^6$ Lymphozyten von Tumorratten und Kontrollen werden mit 0,5ml der gereinigten HEF-Lösung + 2,5 ml RPMI 1640 inkubiert. Nach 15, 30, 45, 60, 120, 180, und 240 Minuten und dann nach 6, 18 und 24 Stunden werden die Überstände abgenommen und gegen O-Werte mit der jeweiligen parallelen Inkubationszeit gemessen.

2) Molekulargewichtsbestimmung von EMSF

Zur Untersuchung von EMSF werden Lymphozytenüberstände von Tumorratten nach Inkubation mit dem gereinigten Antigen (HEF) gepoolt. 300ml des Pools werden durch eine Amicon UM-10 Membran auf 5ml eingeengt. Diese werden dann über eine Sephadex G-100 Säule aufgetrennt. Die erhaltenen Fraktionen werden über Nacht gegen PBS (100faches Volumen) dialysiert und dann mit Hilfe von Millex^R-Filtern sterilfiltriert. $5x10^7$ EIZ werden dann mit steigenden Mengen der einzelnen Fraktionen inkubiert, und die Fraktionen so auf ihren EMSF-Gehalt geprüft. Zur Bestimmung des Molekulargewichts der EMSF-haltigen Fraktion wird die Säule mit BSA, Chymotrypsin und Lysozym geeicht.

3) Hitzestabilität von EMSF

Gleiche Teile von EMSF-haltigem Lymphozytenübertsand werden entweder unbehandelt bei 4^oC aufgehoben oder für 30 Minuten bei 56^oC erhitzt. Nachdem alle Proben wieder Zimmertemperatur erreicht haben, werden sie mit $5x10^7$ EIZ inkubiert und gegen den O-Wert gemessen.

4) Enzymempfindlichkeit von EMSF

Gleiche Teile von EMSF-haltigem Lymphozytenüberstand werden für zwei Stunden bei 37^oC mit folgenden Zusätzen

inkubiert:

1) unbehandelte Kontrolle
2) mit Trypsin (Difco) 1mg/ml
3) mit Trypsin 1mg/ml und Soybean Trypsin Inhibitor (Sigma) 1mg/ml

Nach der Inkubation wird ebenfalls Ansatz 2) mit Soybean Trypsin Inhibitor (1mg/ml) versetzt und die Proben anschließend mit $5x10^7$ EIZ gemessen.
Um eine Wirkung des Trypsin-Trypsin Inhibitor Komplexes auf die EIZ auszuschließen, wird einem zweiten O-Wert ebenfalls 1mg/ml von beiden Substanzen zugesetzt.

5) Induktion von EMSF durch Concanavalin A

$2x10^6$ Milz-Lymphozyten von Tumorratten und Kontrollen werden mit RPMI 1640 (1ml) und 20-100µg Con A[1] für 18 Stunden in Nunc Tubes bei 37°C in einem CO_2-Luftgemisch inkubiert. Anschließend werden die Lymphozyten abzentrifugiert und die Überstände entsprechend den Con A-Konzentrationen gepoolt. 3ml Lymphozytenüberstand werden mit $5x10^7$ EIZ inkubiert und im Zytopherometer gemessen. Um den Einfluß des Con A auf die EIZ zu ermittelm, wird zuvor eine O-Wert Reihe mit steigenden Con A-Konzentrationen gegen einen unbehandelten O-Wert (3ml RPMI 1640) gemessen.
Zur Isolierung von EMSF aus Con A-induzierten Lymphozytenüberständen wird ein Pool von 900ml gesammelt und durch eine Amicon Ultrafiltrationszelle mit einer UM-10 Membran auf 10ml eingeengt. Dieser Rückstand wird dann über eine Sephadex G-100 Säule aufgetrennt. Zur Bestimmung des Molekulargewichts werden BSA, Chymotrypsin und Lysozym als Marker eingesetzt.
Ein Teil des eingeengten Überstands wird gefriergetrocknet und dann über eine Sephadex G-100 Säule aufgetrennt.
Die erhaltenen Fraktionen werden über Nacht bei 4°C gegen PBS (100faches Volumen) dialysiert und dann mit EIZ auf ihren EMSF-Gehalt geprüft.

1) Deutsche Pharmacia, Freiburg

6) 6 M Harnstoffanalyse

Zur Überprüfung, ob es sich bei EMSF um ein Aggregat handelt, wird gereinigter EMSF unter 6 M Harnstoff Zusatz über eine Sephadex G-100 Säule gegeben.
Als Puffer wurde verwendet: 0,05 M Tris/HCl
0.15 M NaCl pH 8,0
6,0 M Harnstoff
Als Markerproteine wurden in einem Vorlauf BSA und Lysozym eingesetzt. Die Säulenchromatographie erfolgte bei Zimmertemperatur.
Das Eluat wurde in 10ml-Fraktionen gesammelt.

III) Ergebnisse

A) R3230AC-Tumormodell

1) Adaptation des Tumors an die Fischer Ratte

Da der Tumor vorübergehend in Zellkultur gehalten worden ist, wird zunächst eine Adaptation des Tumors an die Fischer Ratte durchgeführt. Dazu werden $1x10^6$ bis $1x10^8$ Tumorzellen s.c. injiziert, der Tumor verhältnismäßig oft (nach 14 Tagen) transplantiert und das Tumorwachstum kontrolliert. Als sich zeigt, daß eine 100%ige Transplantierbarkeit gegeben ist, und das Tumorwachstum in Abhängigkeit von der Zeit konstant bleibt, wird die Tumorzelldosis auf $1x10^6$ gesenkt. Der Tumor erreicht bei dieser Dosis nach drei Wochen eine Größe von 3-4cm und führt dann zum Tod der Tiere.
Zur Stammhaltung werden jeweils $1x10^6$ Zellen s.c. injiziert und der Tumor nach drei Wochen transplantiert.

2) Optimierung der Metastasierung

a) Tumor-Wachstumskurven nach intraplantarer Injektion der Tumorzellen

Zur Untersuchung der Metastasierung werden die Tumorzellen intraplantar injiziert. Um einen genauen Überblick über die Wachstumsgeschwindigkeit des Tumors zu bekommen werden $1x10^5$ bis $1x10^7$ Tumorzellen in 0,2ml PBS intraplantar injiziert und das Wachstum des Tumors durch Messung der Fußdicke im Odi-Test bestimmt. Abbildung 3 zeigt die Wachstumsgeschwindigkeit des Tumors in Abhängigkeit von der Zelldosis.

Unabhängig von der Zellkonzentration setzt das Tumorwachstum nach 4-5 Tagen ein. Das Wachstum zeigt bei allen eingesetzten Konzentrationen einen linearen Anstieg. Abhängig von der injizierten Zelldosis kommt es jedoch bei höherer Dosis zu einer schnelleren Zunahme der Tumorgröße. Bei Injektion von $1x10^7$ Tumor-

zellen wird eine Fußdicke von 1200 im Odi-Test nach 10 Tagen erreicht, bei Injektion von $6x10^5$ Tumorzellen erst nach 13-15 Tagen.

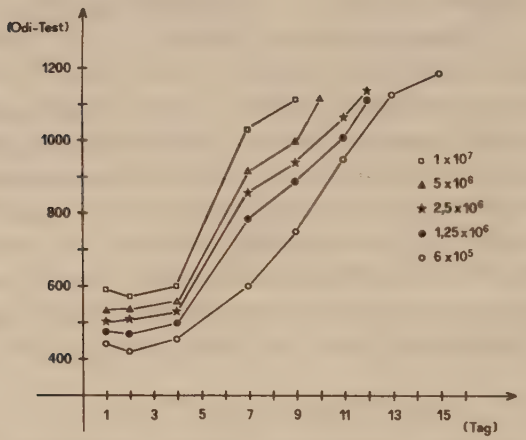

Abb. 3: Tumor-Wachstumskurven in Abhängigkeit von der Zelldosis

Für die weiteren Versuche wird eine Tumorzelldosis von $6x10^5$ gewählt.

b) Untersuchung der Metastasierung, Vorversuch

Zur Untersuchung der Metastasierung des Tumors werden 10 Ratten mit $6x10^5$ Tumorzellen intraplantar gespritzt. Bei einer Fußdicke von 1100 im Odi-Test wird der Primärtumor durch Amputation des Fußes entfernt. Unmittelbar nach dem Tod der Tiere, spätestens jedoch acht Wochen nach der Amputation (die noch überlebenden Tiere werden durch Chloroform getötet), werden die Ratten seziert und makroskopisch auf Metastasen untersucht. Die ersten Ratten sind nach vier Wochen gestorben und zeigen eine starke Metastasierung

der Lunge. Die anderen Ratten haben ebenfalls alle Lungenmetastasen, deren Größe zwischen 1 und 5mm schwankt. Dieser Versuch wird wiederholt, und nachdem sich erneut eine 100%ige Metastasierung zeigt, werden nun Versuche zur Optimierung der Metastasierung unternommen.

c) Bestimmung der Parameter für die Metastasierung des Tumors

Es sollte versucht werden, Parameter zu bestimmen, die das Auftreten von Metastasen möglichst sicher verhindern, oder aber gerade noch zu einer 100%igen Metastasierung führen. Dazu werden insgesamt 50 Ratten mit $6x10^5$ Tumorzellen intraplantar gespritzt. Jeweils 10 Ratten werden dann bei einer Fußdicke von 650, 750, 850 und 900-1000 im Odi-Test amputiert. Spätestens nach 10 Wochen werden die überlebenden Ratten getötet, seziert und makroskopisch auf Metastasen untersucht. Zuvor werden die Ratten wöchentlich gewogen und auf Rezidivbildung untersucht.
Bei der Sektion werden Milz- und Lungengewicht bestimmt, sowie die verschiedenen Organe auf Metastasenbefall untersucht. Ein zusammenfassendes Ergebnis der Sektionsprotokolle zeigt Tabelle II.
In der Gruppe der Ratten, die bei einer Fußdicke von 650 amputiert werden, kommt es zu keiner Metastasierung. Um diesen Befund abzusichern, werden zwei unabhängige Langzeitversuche durchgeführt. Jeweils 10 Ratten werden mit $6x10^5$ Tumorzellen intraplantar gespritzt, bei einer Fußdicke von 650 amputiert und dann bis zu einem Jahr beobachet. Alle Ratten überlebten länger als 12 Monate.
In der Gruppe II (Amputation bei 750) bekommen 3/10 Ratten Metastasen und sterben innerhalb von sechs Wochen. In der Gruppe III (Amputation bei 850) sind es 5/10 und in der Gruppe IV (Amputation bei 900-1000) 10/10. Alle Ratten der vierten Gruppe sind innerhalb von sieben Wochen gestorben. Eindeutig

dominierend ist bei diesem Tumor die hämatogene Metastasierung in die Lunge. Ratten, die sehr früh sterben, zeigen ausschließlich Lungenmetastasen.

Tabelle II: Sektionsprotokoll der Metastasenoptimierung

Odi-Test	600-650	700-750	800-850	900-1000
Gruppe	I	II	III	IV
Tag der Amputation	6-7	7-8	8-11	12-14
Todesrate	0/10	3/10	5/10	10/10
Lunge	ø	3/3	5/5	10/10
Leber	ø	0/3	0/5	1/10
Niere	ø	1/3	1/5	2/10
Ovar	ø	1/3	1/5	2/10
para aort. Lymphkn.	ø	0/3	2/5	3/10

Bei den Tieren, die erst nach 5 Wochen oder später sterben, dominieren zwar die Lungenmetastasen, es werden aber auch Metastasen in der Niere und dem Ovar beobachtet. Außerdem kommt es zur Ausbildung lymphogener Metastasen, insbesondere in den paraaortischen Lymphknoten. Das Milzgewicht zeigt bei starker Metastasierung keine Gewichtsveränderung. Eine Rezidivbildung am Amputationsstumpf wird nicht beobachtet.

Somit besteht die Möglichkeit, in Abhängigkeit von der Zeit und der Tumorgröße, durch Amputation des Primärtumors die Metastasierung zu beeinflussen. Werden die Ratten nach 6-7 Tagen und einer Fußdicke von 600-650 im Odi-Test amputiert, kommt es zu einer

sicheren Verhinderung der Metastasierung. Dies konnte durch Langzeitversuche abgesichert werden.
Werden die Ratten nach 12-14 Tagen und einer Fußdicke von 1000 im Odi-Test amputiert, kommt es zu einer 100%igen Metastasierung und die Ratten sterben innerhalb von 6-8 Wochen an Lungenmetastasen.

B) Elektrophorese-Mobilitäts-Test

1) Vorversuche mit HEF als Antigen

Nach der Methode von Porzsolt et al. (1975) werden für die ersten Versuche $7x10^6$ Lymphozyten mit 33µg HEF/ml für 18 Stunden inkubiert. Anschließend wird der Überstand für weitere 90 Minuten mit $5x10^7$ EIZ inkubiert und dann im Zytopherometer gemessen. Insgesamt werden je 20 Ratten mit einem 7 bzw. 14 Tage alten Tumor sowie 30 Kontrollen (unbehandelte Tiere) untersucht. Die Lymphozyten werden aus dem Blut, der Milz sowie den Mesenteriallymphknoten isoliert. Tabelle III zeigt die Ergebnisse dieser ersten Untersuchungen.

Tabelle III: EMT-Vorversuche mit Lymphozyten aus Milz, Blut und Lymphknoten und HEF als Antigen

	Blut	Milz	Lymph-knoten	
Tumorratte 7 Tage	15±2	18±3	18±3	
Tumorratte 14 Tage	15±2	18±3	18±3	
Kontrolle		6±2		

Tumorratten zeigen im Durchschnitt eine Verlangsamung der EIZ von 15-18%, wobei das Alter des Tumors (7 bzw. 14 Tage) in diesen Untersuchungen keinen Einfluß hatte.

Lymphozyten aus Milz und Lymphknoten reagieren praktisch gleich, bei Lymphozyten aus dem Blut ist eine etwas schwächere Reaktion festzustellen, die aber gegenüber den Kontrollen immer noch deutlich signifikant ausfällt. Alle untersuchten Kontrollen zeigen im Mittel eine Verlangsamung der EIZ von 5-7%, so daß Tumorratten und Kontrollen bei diesen Untersuchungen deutlich voneinander differenziert werden können.

2) Bestimmung der optimalen Parameter im EMT

Um eine Optimierung der Reaktion zu erreichen, werden die wichtigsten Parameter, die den EMT beeinflussen, untersucht. Es wird dabei nicht mehr mit einzelnen Tumorratten gearbeitet, sondern jeweils mit einem Pool von 3-5 Tumorratten sowie Kontrollen.

a) Antigenkonzentration

Abbildung 4 zeigt den Einfluß der Antigenkonzentration auf die Produktion von EMSF.

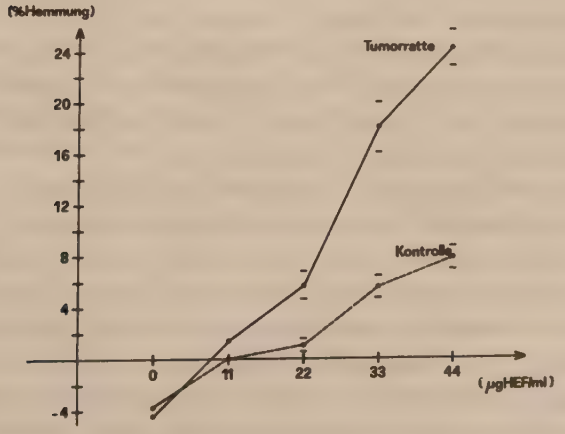

Abb. 4: HEF-Dosisabhängigkeit der Lymphozytenreaktion

$7x10^6$ Lymphozyten aus Mesenteriallymphknoten von Tumorratten mit einem 14 Tage alten Tumor sowie unbehandelten Kontrollen werden mit steigenden Konzentrationen HEF inkubiert. Nach 18 Stunden werden die Überstände isoliert und für weitere 90 Minuten mit $5x10^7$ EIZ inkubiert.
Lymphozyten von Tumorratten und Kontrollen zeigen ohne Antigenzusatz eine Beschleunigung der EIZ von 4%. Mit steigender Konzentration des Antigens kommt es bei Normalratten zu einem leichten Anstieg der Verlangsamung. Bei 44µg HEF/ml beträgt die Verlangsamung 8-9%. Bei den Tumorratten steigt die Reaktivität hingegen wesentlich stärker an und erreicht bei 44µg HEF/ml eine Verlangsamung der EIZ von 25-28%. Dabei nimmt die Differenz zur Aktivität der Normalratten mit steigender Antigenmenge konstant zu. Für alle weiteren Untersuchungen wird eine Konzentration von 33µg HEF/ml gewählt, die es erlaubt, eine Differenz von 12-16% zwischen Tumorratten und Kontrollen im EMT zu messen.

b) Lymphozytenkonzentration

Zur Untersuchung der Frage, welchen Einfluß die Lymphozytenkonzentration auf die Produktion von EMSF hat, werden $1-7x10^6$ Lymphozyten von Tumorratten und Kontrollen mit 33µg HEF/ml inkubiert und die Überstände im EMT gemessen (Abbildung 5).
Während sich bei Kontrolltieren kein Unterschied der Reaktivität bei steigender Lymphozytenkonzentration ergibt, kommt es bei Tumorratten bis zu $5x10^7$ Lymphozyten zu einem starken Anstieg der Reaktion. Im weiteren Verlauf kommt es dann zu einer Abflachung. $7x10^6$ Lymphozyten werden als optimale Lymphozytenkonzentration für die weiteren Untersuchungen gewählt. Hierbei werden Unterschiede in der Reaktion von Tumorratten und Kontrollen bis zu 16% gemessen.

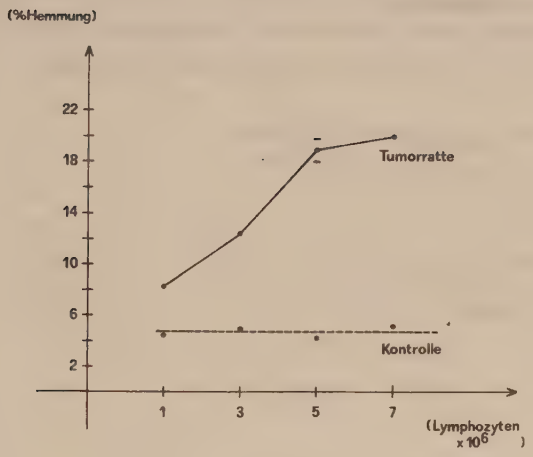

Abb. 5: Abhängigkeit der EMSF-Produktion von der Lymphozytenzahl

c) EIZ-Konzentration

Zur Bestimmung der optimalen EIZ-Konzentration werden jeweils 3ml eines gepoolten Lymphozytenüberstands von Tumorratten bzw. Kontrollen mit 1-5x10^7 EIZ für 90 Minuten inkubiert und anschließend im Zytopherometer gemessen. Als O-Werte werden dabei jeweils 3ml RPMI mit der entsprechenden EIZ-Konzentration mitgeführt.
Abbildung 6 zeigt, daß die EIZ-Konzentration einen starken Einfluß auf das Ergebnis von Kontrollen hat. Mit abnehmender EIZ-Konzentration kommt es zu einem starken Anstieg der Hemmung, wohingegen die Ergebnisse der Tumorratten durch die EIZ nicht signifikant beeinflußt werden.
Da die Differenz also mit zunehmender EIZ-Konzentration größer wird, und damit eine Differenzierung zwischen Tumorratten und Kontrollen besser möglich

ist, werden $5x10^7$ EIZ als Konzentration in den folgenden Versuchen eingesetzt.

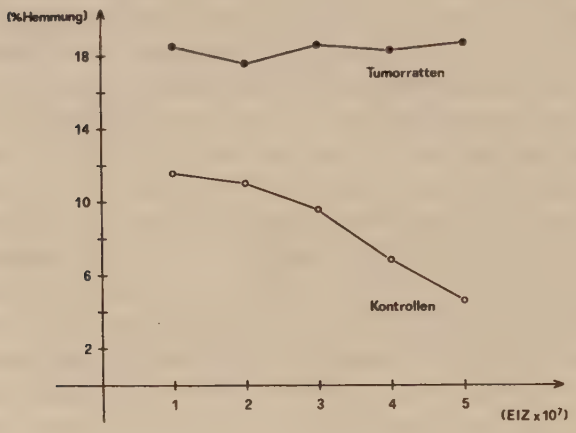

Abb. 6: Abhängigkeit der relativen Verlangsamung von der EIZ-Konzentration

d) Inkubationszeit (Lymphozyten + Antigen)

Bisher wurden alle Versuche mit einer Inkubationszeit von 18 Stunden im ersten Reaktionsschritt (Lymphozyten + Antigen) durchgeführt. Um den Einfluß der Inkubationszeit auf die Produktion von EMSF zu bestimmen, werden jeweils $7x10^6$ Lymphozyten von Tumorratten und Kontrollen mit 33µg HEF/ml inkubiert und die Überstände zu verschiedenen Zeitpunkten abgenommen. Die O-Werte werden entsprechend den Proben ebenfalls unterschiedlich lang inkubiert. Alle Überstände werden dann mit $5x10^7$ EIZ für 90 Minuten inkubiert und anschließend im Zytopherometer gemessen. Die Kinetik der Produktion von EMSF in Abhängigkeit von der Inkubationszeit Lymphozyten + Antigen ist in Abbildung 7 wiedergegeben. Sowohl Tumorratten

als auch Normalratten zeigen nach vier Stunden Inkubationszeit ein schwaches Optimum, wobei bereits nach einer Stunde bei Tumorratten eine deutliche positive Reaktion gemessen werden kann.

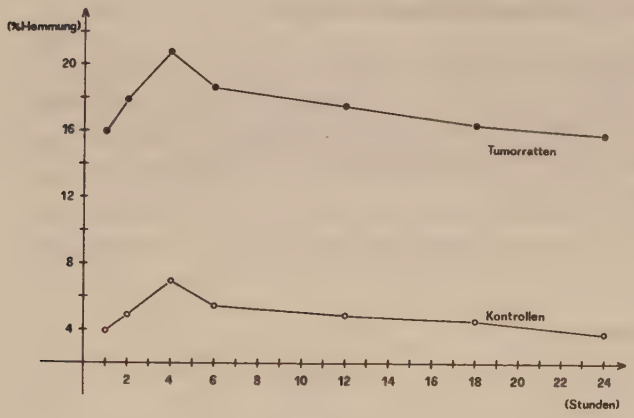

Abb. 7: Abhängigkeit der EMSF-Produktion von der Inkubationszeit (Lymphozyten + Antigen)

Bis zu 24 Stunden kommt es dann nur zu einem schwachen Abfall der Reaktion, die bei Tumorratten und Kontrollen gleich stark ist. So läßt sich auch nach 24 Stunden noch eine deutliche Differenz in der EMSF-Aktivität von Tumorratten und Kontrollen messen. Aus technischen Gründen werden alle weiteren Untersuchungen mit einer Inkubationszeit von 18 Stunden durchgeführt.

3) Einsatz verschiedener Antigene im EMT

Nachdem die optimalen Reaktionsbedingungen im EMT für dieses Modell festgelegt sind, sollen verschiedene Antigene untersucht werden.

a) Ratten-EF

REF ist ein Myelinextrakt aus Rattenhirn. Entsprechend dem HEF wird hierbei mit einer Konzentration von 33µg REF/ml gearbeitet.

b) KCl-Extrakt des Tumors R3230AC

Der KCl-Extrakt des Primärtumors soll als spezifisches Antigen im EMT untersucht werden. Abbildung 8 zeigt den Einfluß der KCl-RAC Konzentration auf die Reaktion von sensibilisierten Lymphozyten und Kontrollen.

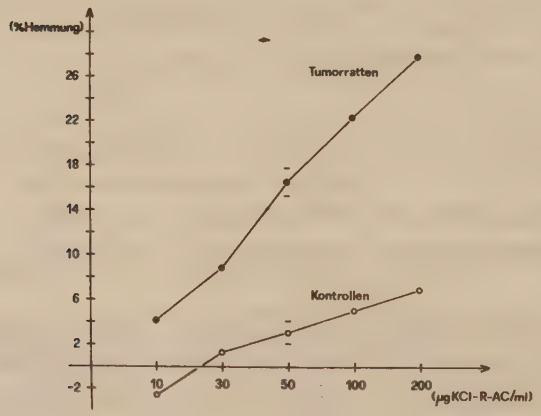

Abb. 8: KCl-RAC-Dosisabhängigkeit der Lymphozytenreaktion

$7x10^6$ Lymphozyten werden mit 10-200µg KCl-RAC/ml für 18 Stunden inkubiert und die Überstände anschließend im Zytopherometer getestet.
Eine Differenzierung von Tumorratte und Kontrolle läßt sich bereits mit 10µg KCl-RAC/ml durchführen.

Die Kontrollen zeigen bei dieser Konzentration eine Beschleunigung der EIZ von 4-6%. Trotz der relativ schwachen Reaktion bei Tumorratten, sie liegt bei 4-6% Verlangsamung, beträgt die Differenz bereits 8-10%, so daß ein signifikanter Unterschied in der Beeinflussung der EIZ vorliegt. Mit steigender Konzentration des Antigens kommt es sowohl bei Tumorratten als auch bei Kontrollen zu einem starken Anstieg der Verlangsamung der EIZ. Die Differenz beider zueinander nimmt jedoch genau wie bei HEF zu. Für die weiteren Untersuchungen wird mit einer Konzentration von 50µg KCl-RAC/ml gearbeitet. Abbildung 9 zeigt, daß die Reaktion mit KCl-RAC ebenfalls von der Lymphozytenkonzentration abhängig ist.

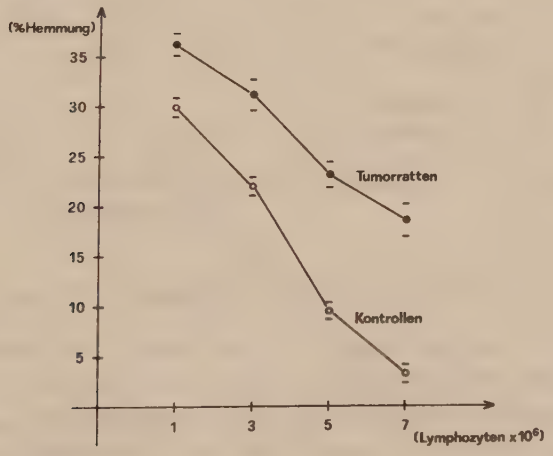

Abb. 9: Abhängigkeit der EMSF-Produktion von der Lymphozytenzahl bei konstanter KCl-RAC-Konzentration

Im Gegensatz zu HEF ist jedoch auch die Reaktion von Normalratten von der Lymphozytenkonzentration ab-

hängig. Weiterhin liegen hier im Vergleich zu HEF genau umgekehrte Verhältnisse vor, da es bei abnehmender Lymphozytenkonzentration zu einem Anstieg der Verlangsamung kommt. $7x10^6$ Lymphozyten ergeben bei dieser Reaktion mit einer Antigenmenge von 50µg/ml eine optimale Konzentration.

c) KCl-Extrakt der Niere

Um eine Kontrolle zum KCl-Extrakt des Tumors zu haben, wird ein KCl-Extrakt aus Nieren gesunder Ratten hergestellt und im EMT als Antigen eingesetzt. Bei allen untersuchten Konzentrationen kann kein Unterschied in der Reaktivität zwischen Lymphozyten von Tumorratten und Kontrollen festgestellt werden (Abb.10).

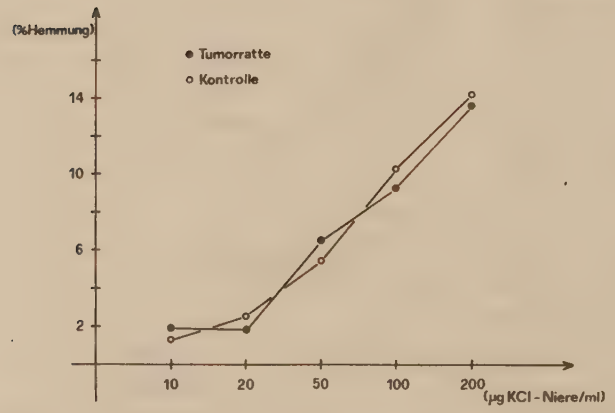

Abb. 10: KCl-Niere-Dosisabhängigkeit der Lymphozytenreaktion

d) EAE-Peptid

Zur Bestimmung der optimalen Konzentration im EMT werden $7x10^6$ Lymphozyten von Tumorratten und Kontrol-

len mit 5-50µg EAE-Peptid/ml inkubiert. Als optimale Konzentration werden 25µg/ml in den folgenden Versuchen eingesetzt. Alle anderen Konzentrationen führen zu einer Abschwächung der Reaktion.(Abb. 11)

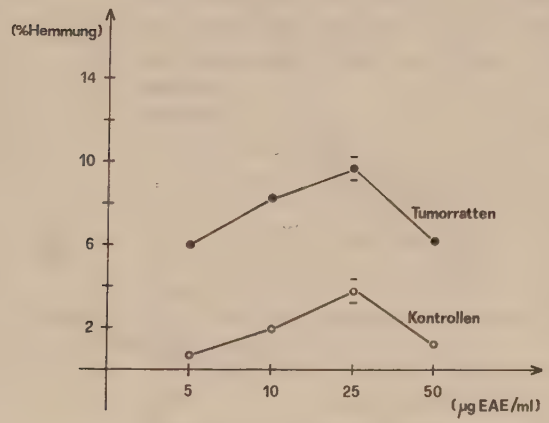

Abb. 11: EAE-Peptid-Dosisabhängigkeit der Lymphozytenreaktion

e) Mitomycin behandelte Tumorzellen R3230AC

Zum Abschluß dieser Untersuchungen sollen Mitomycin-behandelte Tumorzellen als Antigen im EMT eingesetzt werden. Dazu werden $7x10^6$ Lymphozyten von Tumorratten und Kontrollen für 18 Stunden mit unterschiedlichen Tumorzellkonzentrationen inkubiert und die Überstände im Zytopherometer gemessen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 12 dargestellt. Sowohl bei Tumorratten als auch bei den Kontrollen kommt es zu einer dosisabhängigen Reaktion, da mit zunehmender Tumorzellkonzentration die Verlangsamung der EIZ zunimmt. Die gemessenen Werte bei Tumorratten und Kontrollen zeigen keine Differenz, so daß eine Differenzierung mit Hilfe von Mitomycin-behandelten Tumorzellen als Antigen nicht möglich ist. Über-

stände von Mitomycin-behandelten Tumorzellen allein führen zu keiner Verlangsamung der EIZ.

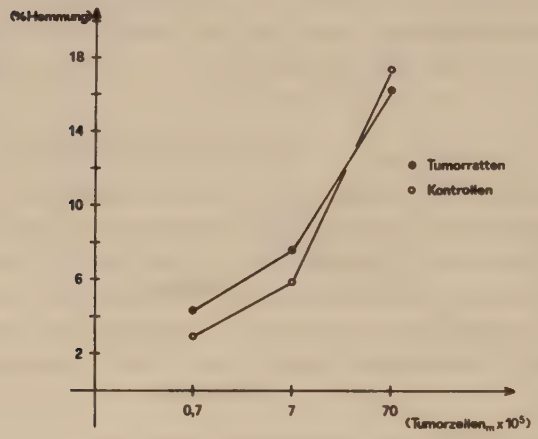

Abb. 12: Tumorzell-Dosisabhängigkeit der Lymphozytenreaktion

f) Zusammenfassung der Ergebnisse

Mit den oben beschriebenen Antigenen HEF, REF, KCl-RAC und EAE-Peptid werden dann nochmals vergleichende Messungen an 20 Tumorratten und Kontrollen durchgeführt. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse zeigt Tabelle IV.
Eine Differenzierung von Tumorratten und Kontrollen ist mit allen vier Antigenen möglich. HEF und KCl-RAC sind dabei die effektivsten Antigene, d.h. hier wird eine besonders deutliche Differenz zwischen der von Tumorratten und Kontrollen hervorgerufenen Hemmung der EIZ erzielt. Die Differenz beträgt durchschnittlich 10-12%. Im Vergleich der beiden enzephalitogenen Proteine reagieren Tumorratten auf REF

wesentlich schwächer als auf HEF. Während mit HEF eine Differenz von 14-16% erzielt wird, beträgt sie bei REF nur 6-8%.

Tabelle IV: Zusammenfassung der Ergebnisse im EMT mit Lymphozyten aus Milz, Blut und Lymphknoten; und HEF, REF, KCl-RAC und EAE-Peptid als Antigene

		Blut	Milz	Lymph-knoten
Tumorratte	HEF	14-20	16-20	16-20
	REF	6 - 8	6 - 8	6 - 8
	KCl R-AC	10 - 12	12 - 14	12 - 14
	EAE	7 - 10	8 - 10	8 - 10
Kontrolle	HEF	2 - 6		
	REF	0 - 1		
	KCl R-AC	0 - 4		
	EAE	0 - 2		

Auch mit höheren Dosen lassen sich mit REF keine signifikanteren Ergebnisse erreichen, so daß das HEF dem REF klar vorzuziehen ist. Ähnliches gilt für das synthetische EAE-Peptid. Hier wird eine maximale Differenz von 6-8% erzielt. Eine Erhöhung der Antigenkonzentration führt zu einer weiteren Abschwächung der Reaktion.
Für alle vier Antigene gilt, daß die Reaktion von Lymphozyten der Milz, Lymphknoten und dem Blut nahezu gleich sind. Lediglich Lymphozyten aus dem Blut zeigen eine leicht schwächere Reaktion, die aber immer noch deutlich signifikant ausfällt, insbesondere mit HEF und KCl-RAC als Antigen..

4) Kinetik der Lymphozytensensibilisierung in Tumortragenden Ratten

Nachdem in den Vorversuchen eine erfolgreiche Anwendung des EMT in diesem Tiermodell sichergestellt worden ist, soll nun die Frage untersucht werden, ob es eine Kinetik der Lymphozytensensibilisierung in Abhängigkeit zur Manifestation des Tumors gibt.

a) Kinetik mit $1x10^7$ Tumorzellen (s.c.) und HEF als Antigen

Dazu werden 40 Ratten mit $1x10^7$ Tumorzellen s.c. gespritzt. Lymphozytenüberstände von unbehandelten Ratten dienen als Kontrolle. Die Proben werden an verschiedenen Tagen gemessen, Mittelwert und Standardabweichung sind in Abbildung 13 als Kontrollbereich eingezeichnet.

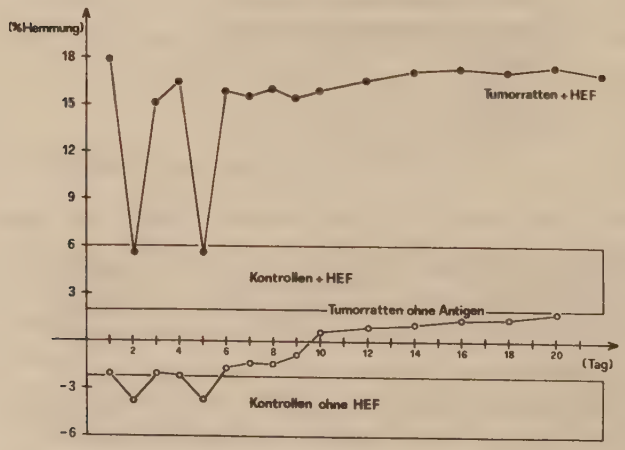

Abb. 13: Kinetik der Lymphozytensensibilisierung nach s.c.-Injektion von $1x10^7$ Tumorzellen und HEF als Antigen

Die Tumorratten werden in den ersten 10 Tagen täglich untersucht, wobei jeweils Lymphozyten aus den Mesenteriallymphknoten dreier Tumorratten gepoolt werden. Die Aufarbeitung und Inkubation der Lymphozyten erfolgt immer zur selben Tageszeit. Als Antigen wird in diesen ersten Kinetik-Untersuchungen HEF eingesetzt.
Lymphozytenüberstände ohne Antigenzusatz dienen als weitere Kontrolle.
Bereits nach 24 Stunden läßt sich eine deutliche Reaktion der Lymphozyten von Tumorratten gegenüber HEF messen. Sie beträgt am Tag 1 14-18%. Am Tag 2 und 5 kommt es zu einem starken Abfall der Reaktivität, die dann aber ab Tag 6 unter leichten Schwankungen bis zum Tod der Tiere positiv bleibt. Gegenüber Tag 3 und 4 kommt es dabei zu keiner weiteren signifikanten Steigerung der Reaktivität, das Reaktionsbild zeigt die Ausbildung eines Plateaus.
Lymphozytenüberstände von Tumorratten ohne Antigenzusatz zeigen ebenfalls eine schwache, aber reproduzierbare Kinetik. An den Tagen 1-10 zeigen alle Überstände eine Beschleunigung der EIZ von -8 bis -1%. Der leichte Abfall an Tag 2 und 5 geht dabei parallel mit dem Abfall der Kinetik mit Antigenzusatz. Ab Tag 10 werden vereinzelt sogar leicht positive Werte gemessen, im allgemeinen schwanken die Ergebnisse aber bis zum Tod der Tiere um die Null-Linie. Da die Überstände von Kontrollen aber ohne Antigenzusatz eine Beschleunigung der EIZ von durchschnittlich 4-6% zeigen, liegen die Werte der Tumorratten auch ohne Antigenzusatz ab Tag 10 bis zu 6% höher als die der Kontrollen.

b) Zeitliche Bestimmung der ersten meßbaren Sensibilisierung

Nachdem die frühe Reaktion der Lymphozyten von Tumorratten gegenüber HEF mehrmals bestätigt werden konnte, soll mit Hilfe einer differenzierteren Kinetik der

genaue Zeitpunkt der ersten meßbaren Reaktion bestimmt werden (Abb. 14).

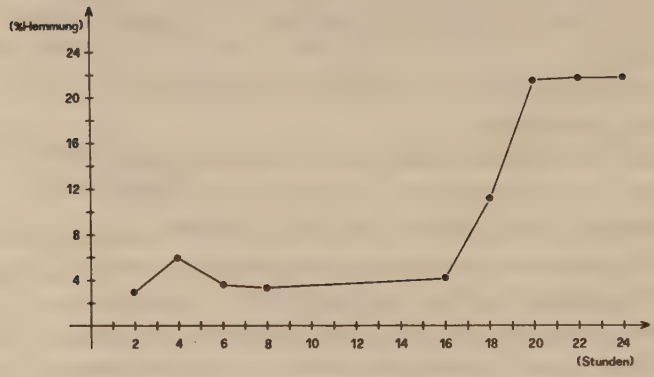

Abb. 14: Zeitpunkt der ersten meßbaren Reaktion im EMT nach Injektion von $1x10^7$ Tumorzellen

Dazu werden wiederum $1x10^7$ Tumorzellen s.c. injiziert und die Ratten nach 2,4,6,8,16,18, 20 und 24 Stunden im EMT untersucht. Während der ersten 16 Stunden kommt es zu leichten Schwankungen der Reaktivität gegenüber HEF, die aber nicht signifikant sind. Die Reaktion bleibt außerdem im Kontrollbereich. Nach 16 Stunden kommt es jedoch zu einem sprunghaften Anstieg der Reaktivität. Die Verlangsamung erreicht nach 20 Stunden bereits einen Wert von 14-18%. Damit läßt sich also nach Injektion von $1x10^7$ Tumorzellen eine Sensibilisierung der Lymphozyten gegenüber HEF 16-18 Stunden nach Versuchsbeginn im EMT nachweisen.

c) Kinetik der Lymphozytensensibilisierung nach Injektion von NaCl bzw. PBS und HEF als Antigen

Bevor weitere Kinetiken durchgeführt werden, sollen zunächst die gefundenen Ergebnisse abgesichert werden. Dazu zählt der Nachweis, daß es sich hierbei wirklich um eine Reaktion auf die Tumorzellen handelt, als auch der möglichst sichere Ausschluß von Schwankungen im Meßsystem, die dann zu einer Verfälschung der Kinetik führen können.
Um zu sehen, ob unbehandelte Ratten ebenfalls eine reproduzierbare Kinetik in ihrer Reaktion auf HEF zeigen, werden jeweils drei Tiere täglich über einen Zeitraum von 10 Tagen untersucht. Es ergeben sich keinerlei Hinweise auf eine Kinetik (Abb. 15), so daß die gefundenen Werte zusammengefaßt werden und in Zukunft als Mittelwert und Standardabweichung in den Abbildungen aufgeführt sind.

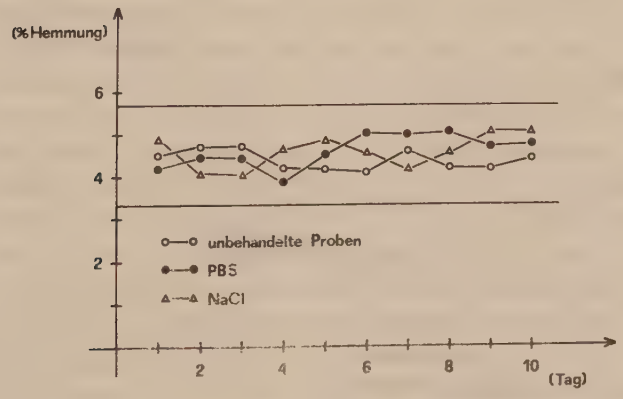

Abb. 15: Kinetik der Lymphozytensensibilisierung nach Injektion von NaCl bzw. PBS und in unbehandelten Kontrollen

Um einen Einfluß des jeweiligen Lösungsmittels, in dem die Tumorzellen suspendiert sind, zu vermeiden, werden Ratten mit 0,2ml PBS bzw. NaCl injiziert und täglich im EMT untersucht (Abb. 15).
Aus den einzelnen Kurven ist zu entnehmen, daß unbehandelte Ratten keine Kinetik gegenüber HEF zeigen, und daß PBS bzw. NaCl zu keiner Verfälschung des Ergebnis führen, da eine positive Reaktion gegenüber HEF nicht gefunden wird und eine Reaktionskinetik ebenfalls nicht vorliegt.

d) Kinetik der Lymphozytensensibilisierung nach Injektion von allogenen bzw. syngenen Lymphozyten und HEF als Antigen

Um den Einfluß der Injektion von lebenden Zellen zu studieren, und um eine Kontrolle gegenüber Tumorzellen zu haben, werden sowohl syngene als auch allogene Lymphozyten s.c. injiziert und die Tiere anschließend täglich mit HEF als Antigen im EMT untersucht (Abb. 16).

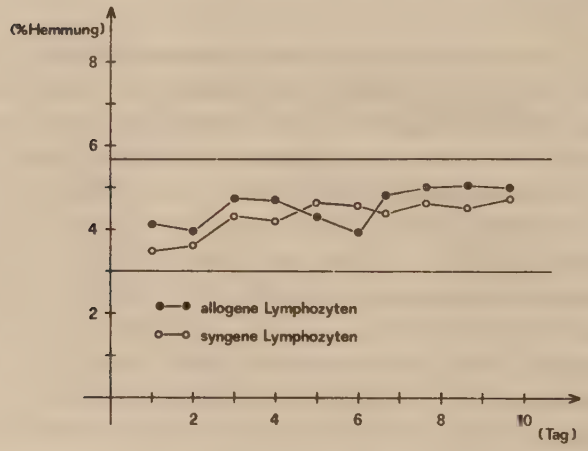

Abb. 16: Kinetik der Lymphozytensensibilisierung nach Injektion von allogenen bzw. syngenen Lymphozyten

Als syngene Lymphozyten dienen Lymphozyten aus Mesenteriallymphknoten unbehandelter Fischer Ratten. Als allogene Zellen dienen Lymphozyten aus Mesenterial-lymphknoten von Brown-Norway Ratten. Es werden jeweils $1x10^7$ Lymphozyten in PBS aufgenommen und s.c. injiziert.
Weder syngene noch allogene Lymphozyten führen bei den Lymphozyten der Empfängertiere, die im EMT mit HEF als Antigen getestet werden, zu einer positiven Reaktion. Die Reaktivität der Lymphozyten gegenüber HEF schwankt im Normalbereich (Durchschnittswerte unbehandelter Ratten) und zeigt zudem keine reproduzierbare Kinetik.

e) Ausschluß arbeitstechnisch bedingter Fehler

Um einen arbeitstechnisch bedingten Fehler bei der Kinetik auszuschließen, und um den Abfall der Reaktion an Tag 2 und 5 abzusichern, werden folgende Kinetiken durchgeführt:
Eine Kinetik (I) wird wie üblich angesetzt, d.h. 30 Ratten werden gleichzeitig am Tag 0 mit $1x10^7$ Tumorzellen s.c. injiziert und dann jeweils drei Ratten täglich bis zum Tag 10 im EMT untersucht.
Bei einer zweiten Kinetik (II) wird zunächst eine Zellkultur des Tumors angelegt. Dann werden täglich jeweils drei Ratten mit $1x10^7$ Tumorzellen aus der Zellkultur injiziert und am Tag X alle Tiere auf einmal gegen einen einzigen 0-Wert im EMT untersucht.
Abbildung 17 zeigt, daß die beiden Kinetiken exakt identisch verlaufen.
Damit kann eine Schwankung aus arbeitstechnischen Gründen ausgeschlossen werden, insbesondere Schwankungen des Zytopherometers sowie der mitgeführten 0-Werte.

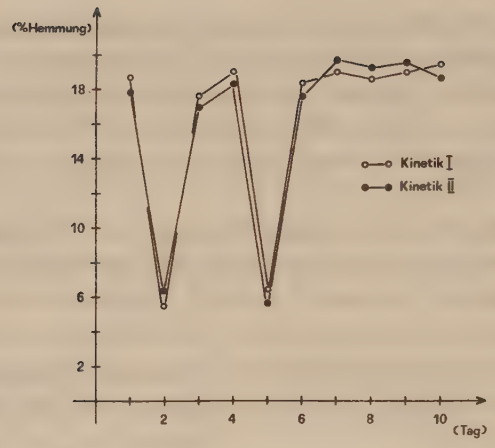

Abb. 17: Vergleich zweier Kinetiken der Lymphozytensensibilisierung bei unterschiedlichem Versuchsansatz

Im Hinblick auf das Tumormodell werden in den weiteren Versuchen die Tumorzellen intraplantar injiziert. Es sollen folgende Fragen experimentell geklärt werden:

1) Wie verläuft die Kinetik der Lymphozytensensibilisierung nach intraplantarer Injektion der Tumorzellen?
2) Wie verläuft die Kinetik mit KCl-RAC als Antigen
3) Welchen Einfluß hat die Tumorzellkonzentration auf den Verlauf der Kinetik?
4) Welches ist die minimale Tumorzelldosis, die nach 24 Stunden zu einer Sensibilisierung der Lymphozyten führt?
5) Wie verläuft die Kinetik der Sensibilisierung nach Amputation des Tumors? Haben Metastasen einen Einfluß auf die Sensibilisierung und geht sie in Metastasen-freien Ratten wieder zurück?

f) Kinetik der Lymphozytensensibilisierung nach intraplantarer Injektion der Tumorzellen und HEF bzw. KCl-RAC als Antigen

Zur Klärung der ersten beiden Fragen werden $1x10^6$ Tumorzellen intraplantar injiziert und die Ratten täglich im EMT untersucht. Lymphozyten aus Mesenteriallymphknoten werden gepoolt und gleiche Teile mit HEF bzw. KCl-RAC inkubiert. Zusätzlich werden Lymphozytenüberstände ohne Antigenzusatz getestet. Den Verlauf der Kinetik zeigt Abbildung 18.

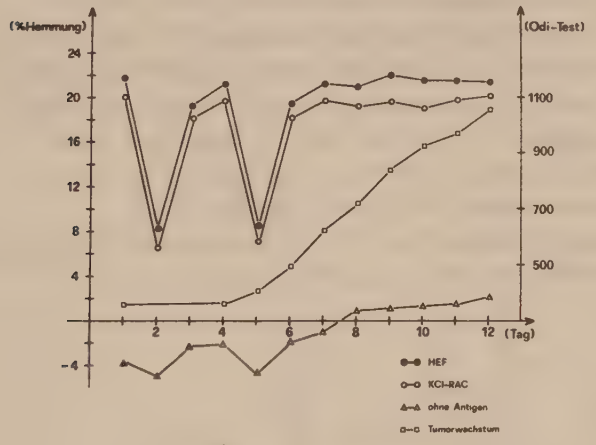

Abb. 18: Kinetik der Lymphozytensensibilisierung nach Injektion von $1x10^6$ Tumorzellen und HEF bzw. KCL-RAC als Antigen

Nach 24 Stunden läßt sich sowohl mit HEF als auch mit KCl-RAC eine Sensibilisierung der Lymphozyten im EMT nachweisen. Die Kinetik verläuft parallel zu der nach s.c.-Injektion der Tumorzellen. Außerdem läßt sich kein Unterschied in der Verwendung von HEF bzw. KCl-RAC als Antigen feststellen. Beide

Antigene führen zu derselben Kinetik im EMT. Auch bei intraplantarer Injektion der Tumorzellen zeigen Lymphozytenüberstände ohne Antigenzusatz ab Tag 5-7 eine leicht positive Reaktion im EMT. Es werden Hemmungen der EIZ bis zu 4% gemessen. Das bedeutet eine Differenz zu den entsprechenden Überständen von unbehandelten Tieren von 6-8%.

g) Einfluß der Tumorzellkonzentration auf den Verlauf der Kinetik

Kinetiken mit einer Zelldosis von $1x10^5$ und $1x10^4$ Tumorzellen ergeben dasselbe Reaktionsverhalten wie es in Abbildung 18 beschrieben ist. Es ist jedoch zu beobchten, daß mit abnehmender Tumorzellkonzentration die Reaktivität der Lymphozytenüberstände ohne Antigenzusatz einen Anstieg aufweist. Die gemessenen Werte für eine Kinetik mit $1x10^4$ Tumorzellen liegen im Mittel um 4% höher als die bei einer Kinetik mit $1x10^6$ Tumorzellen.
Bei einer Injektion von $1x10^3$ Tumorzellen ändert sich die Kinetik mit HEF als Antigen (Abb. 19).

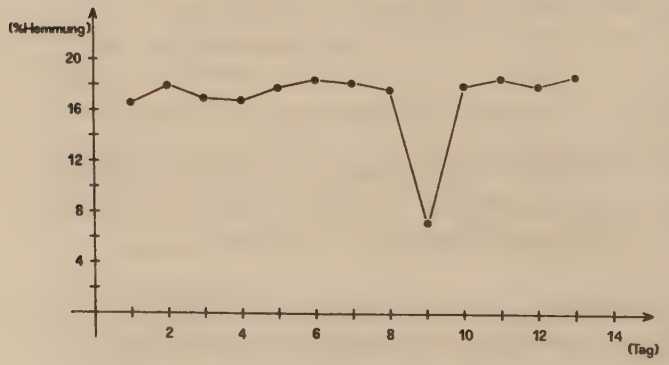

Abb. 19: Kinetik der Lymphozytensensibilisierung nach Injektion von $1x10^3$ Tumorzellen und HEF als Antigen

Auch hier läßt sich bereits nach 24 Stunden eine Sensibilisierung gegenüber HEF nachweisen. Es kommt jedoch an Tag zwei und fünf zu keinem Abfall der Reaktivität, sondern die EMSF-Aktivität bleibt konstant bis zum Tag 8. Am Tag 9 kommt es zu einem scharfen Abfall der Reaktivität, die dann aber bis zum Tag 14 wieder zwischen 16 und 20% Verlangsamung liegt. Die Kinetik verläuft mit KCl-RAC als Antigen exakt identisch.
Bei einer Injektion von $1x10^3$ Tumorzellen gehen 100% der Tumoren an. Ein deutliches Tumorwachstum läßt sich aber erst nach ca. 14 Tagen feststellen.

Nach Injektion von $1x10^2$ Tumorzellen ist die Sensibilisierung nach 24 Stunden zum ersten Mal negativ. Abbildung 20 zeigt den Verlauf eines solchen Versuchs.

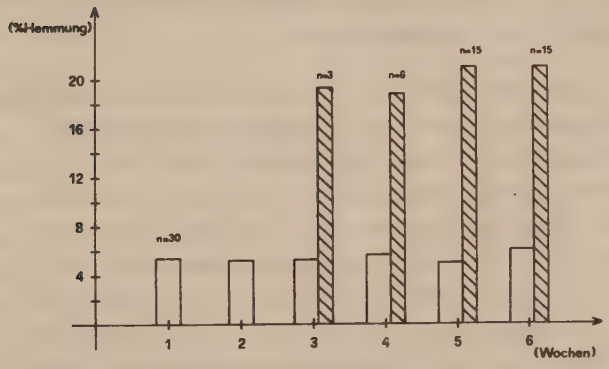

Abb. 20: Kinetik der Lymphozytensensibilisierung nach Injektion von $1x10^2$ Tumorzellen und HEF als Antigen

Auch nach 8 und 14 Tagen läßt sich keine positive Reaktion im EMT messen. Nach drei Wochen zeigen einzelne Ratten erste Anzeichen eines Tumorwachstums und sind dann im EMT sofort positiv. Eine wöchentliche Untersuchung dieser Ratten zeigt, daß die Sensibilisierung bis zum Tod der Tiere anhält. Ratten, die keinen Tumor bekommen, bleiben im EMT negativ. Bei einer Injektion von 10^2 Tumorzellen gehen 50% der Tumoren an. Von 30 injizierten Ratten sind nach drei Wochen drei, nach vier Wochen 6 und nach 5 Wochen 15 Ratten im EMT positiv und zeigen Anzeichen von Tumorwachstum. Die 15 Ratten, die keinen Tumor bekommen, sind über einen Untersuchungszeitraum von 16 Wochen im EMT negativ.
In einem weiteren Versuch (ohne Abbildung) werden $5x10^2$ Tumorzellen als die minimale Tumorzelldosis bestimmt, die nach 24 Stunden zu einer Sensibilisierung der Lymphozyten im EMT führt.

h) Kinetik der Lymphozytensensibilisierung nach Amputation des Primärtumors

Die Frage nach dem Einfluß der Amputation des Tumors und der Metastasierung wird anhand des oben beschriebenen Tumormodells untersucht. Dazu werden 30 Ratten mit $6x10^5$ Tumorzellen intraplantar injiziert. Ein Teil der Ratten wird nach 6-7 Tagen bei einer Fußdicke von 600 im Odi-Test amputiert und dann wöchentlich im EMT untersucht. Der andere Teil wird nach 13 Tagen bei einer Fußdicke von 1000 im Odi-Test amputiert und ebenfalls wöchentlich untersucht. Lymphozyten aus Mesenteriallymphknoten werden mit HEF, KCl-RAC und ohne Antigenzusatz untersucht. Eine Zusammenfassung aller Ergebnisse zeigt Abbildung 21.
Tag 1-7 zeigen den bekannten Verlauf der Lymphozytensensibilisierung gegenüber HEF und KCl-RAC. Werden die Ratten am Tag 7 amputiert, so bekommen sie keine

Metastasen. Die Sensibilisierung zeigt zunächst einen operationsbedingten Abfall, der ungefähr eine Woche anhält. Die Sensibilisierung bleibt danach etwa 3-4 Wochen erhalten und fällt dann auf Kontrollwerte zurück. Bei den Ratten mit Metastasen bleibt die Sensibilisierung bis zum Tod der Tiere erhalten.

Spätestens nach 5 Wochen lassen sich also Ratten, die nach der Amputation des Primärtumors keine Metastasen bekommen, im EMT von Ratten mit Metastasen unterscheiden. Die Reaktion gegenüber HEF bzw. KCl-RAC ist auch nach der Amputation identisch, so daß im gesamten Verlauf der Kinetik keine Unterschiede bei der Verwendung von HEF und KCl-RAC als Antigene auftreten.

Lymphozytenüberstände ohne Antigenzusatz zeigen ebenfalls eine typische Reaktion. Während der ersten sieben Tage zeigen die Überstände eine Beschleunigung der EIZ von 2-5%. Werden die Ratten am Tag 7 amputiert, so bleiben die Werte im negativen Bereich, d.h. die EIZ werden beschleunigt.

Ratten, die erst am Tag 13 amputiert werden, zeigen von Tag 8-13 einen leichten Anstieg der Reaktivität der Lymphozytenüberstände ohne Antigenzusatz. Nach der Operation kommt es auch hier zu einem Abfall der Reaktivität. Bis zum Tod der Ratten steigert sich die Reaktivität der Lymphozytenüberstände jedoch auch ohne Antigenzusatz bis zu 5% Verlangsamung. Abgesehen von der Differenz zu unbehandelten Tieren, liegt auch zwischen den Werten von amputierten Ratten mit und ohne Metastasen eine Differenz von 6-8%. Im Vergleich dazu beträgt die Differenz in den entsprechenden Ansätzen mit Antigen 12-14%.

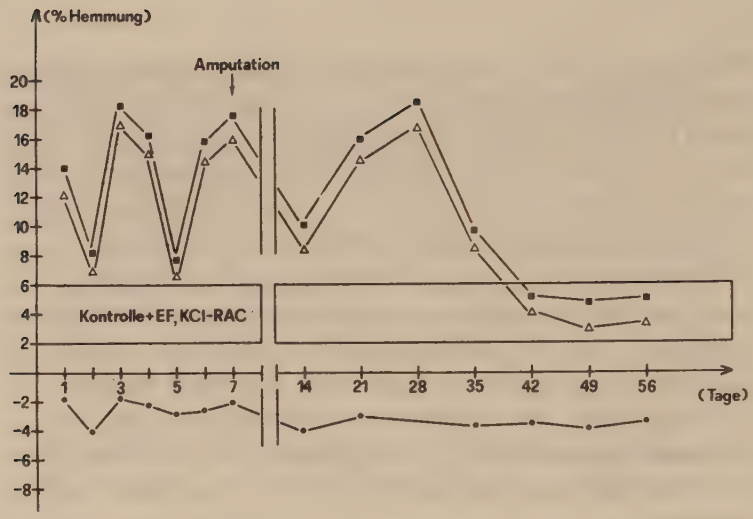

Abb. 21a: Kinetik der Lymphozytensensibilisierung während Entstehung und Wachstum des Tumors bzw. nach Amputation des Primärtumors ohne Entstehung von Metastasen.
Antigene im EMT:
■—■= HEF, Δ–Δ= KCl-RAC, ●—●= ohne Antigen

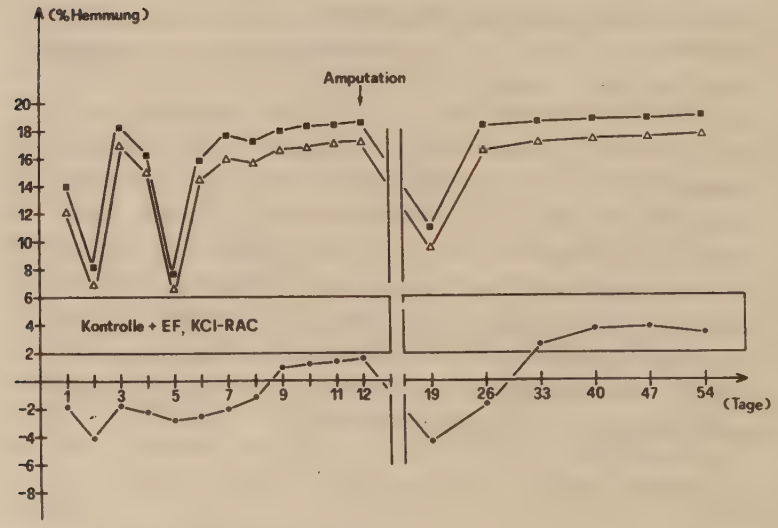

Abb. 21b: Kinetik der Lymphozytensensibilisierung während Entstehung und Wachstum des Tumors bzw. nach Amputation des Primärtumors mit Entstehung von Metastasen.
Antigene im EMT:
■—■= HEF, Δ–Δ= KCl-RAC, ●—●= ohne Antigen

5) Allgemeine Untersuchungen zum Mechanismus des EMT

a) Wiederholte Stimulation mit HEF

Es soll geprüft werden, ob sensibilisierte Lymphozyten sich wiederholt mit HEF stimulieren lassen und damit EMSF wiederholt abgeben.
Abbildung 22 zeigt, daß nach einstündiger Inkubationszeit eine Verlangsamung der EIZ von 16-20% gemessen wird. Nach erneuter Stimulation sind die Lymphozyten von Tumorratten nicht in der Lage, den Faktor (EMSF) innerhalb der nächsten 18 Stunden nochmals abzugeben.

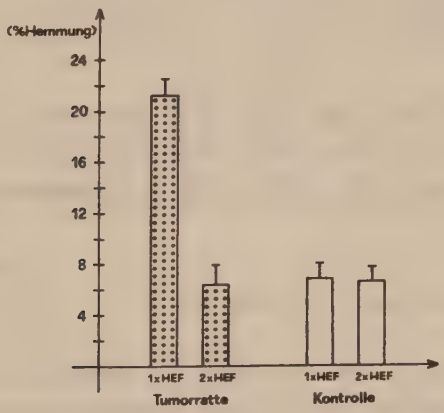

Abb. 22: Wiederholte Stimulation von Lymphozyten mit HEF

Ein Einfluß des Antigens kann ausgeschlossen werden, da die Reaktion von Kontrollymphozyten auch nach zweimaliger Inkubation mit HEF keine Beschleunigung oder Verlangsamung gegenüber Normalwerten zeigt. Der EMSF wird also verhältnismäßig schnell ins umgebende

Medium abgegeben und dann innerhalb der nächsten 18 Stunden nicht erneut produziert.

b) Absorption von EMSF durch EIZ

Durch mehrmalige Inkubation von EMSF-haltigem Überstand mit EIZ soll EMSF absorbiert werden (Abb. 23).

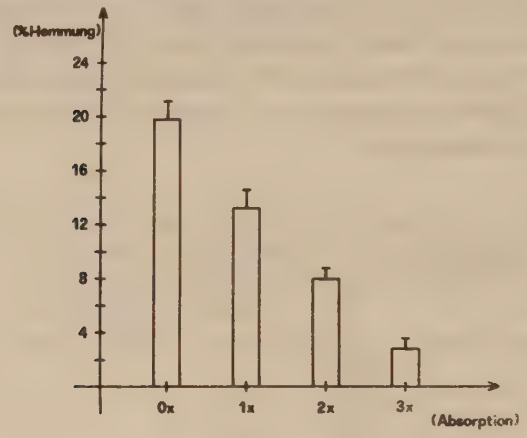

Abb. 23: Absorption von EMSF mit EIZ

EMSF läßt sich aus Überständen von Tumorratten durch wiederholte Inkubation mit EIZ absorbieren. Werden die EIZ nach 90 Minuten abzentrifugiert und der Überstand erneut mit EIZ inkubiert, so ist immer noch eine restliche Aktivität von 10-12% Verlangsamung vorhanden. Erst nach dreimaliger Absorption mit jeweils $5x10^7$ EIZ sinkt die Verlangsamung auf 2-3% ab.

Durch Waschen der mit EMSF inkubierten EIZ läßt sich der Faktor wieder herunterholen (Abb. 24). Nach zweimaligem Waschen der mit EMSF beladenen EIZ sinkt deren Verlangsamung von 18% auf 1-3%. Testet man die Waschflüssigkeit mit frischen EIZ, so zeigen diese

wiederum eine Verlangsamung von 9-12%. Damit muß EMSF in der Waschflüssigkeit enthalten sein.

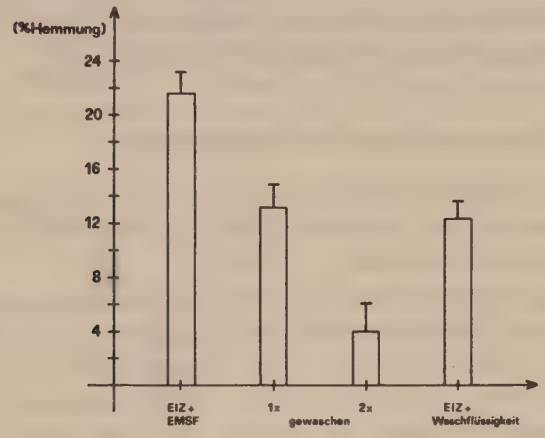

Abb. 24: Entfernung von EMSF durch Waschen der EIZ

c) Produktion von EMSF nach Wegnahme des Antigens

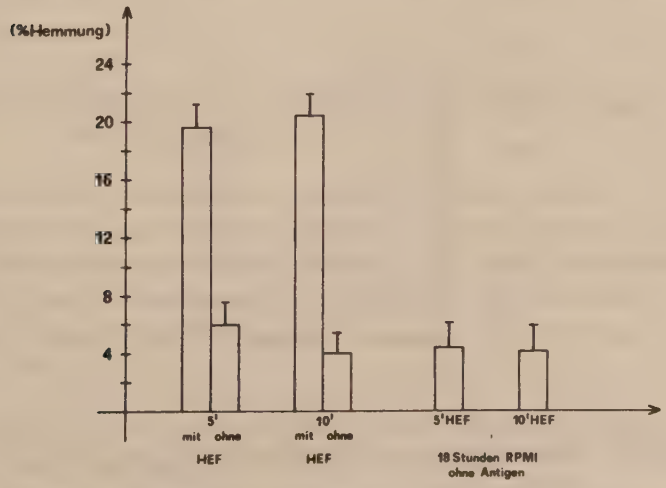

Abb. 25: Produktion von EMSF nach Wegnahme des Antigens

Abbildung 25 zeigt, daß die Produktion von EMSF nach Wegnahme des Antigens nicht weiterläuft. Allerdings zeigen die Überstände nach 5-10 Minuten bereits eine Aktivität von 16-20% Verlangsamung. Ob es sich dabei bereits um die vollständige Ausschüttung des Faktors handelt, soll später diskutiert werden.

d) Mitomycinbehandlung der Lymphozyten

In den folgenden Untersuchungen soll der Einfluß von Mitomycin bzw. Puromycin auf die Produktion von EMSF untersucht werden.
Abbildung 26 zeigt, daß eine Mitomycinbehandlung der Lymphozyten keinen Einfluß auf die Produktion von EMSF hat. Sowohl die Werte der Tumorratten als auch die der Kontrollen zeigen nach Mitomycinbehandlung keine Veränderungen. Es bleibt bei einer Differenz von 12-16%.

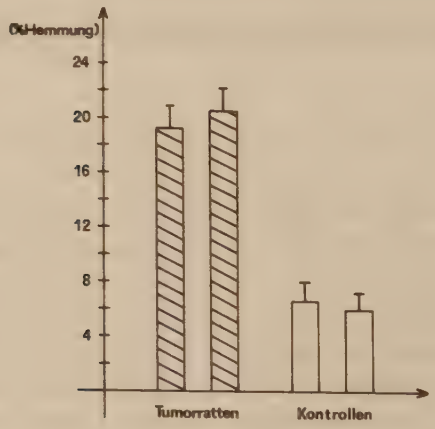

Abb. 26: Abhängigkeit der EMSF-Produktion von der DNA-Synthese

e) Puromycinbehandlung der Lymphozyten

Zugabe von Puromycin 30 Minuten vor Antigenkontakt führt zu einer vollständigen Hemmung der Reaktion. Wird Puromycin erst 30 Minuten nach Antigenkontakt zugesetzt, so ist die Reaktion bereits abgelaufen, und die Überstände von Tumorratten verursachen eine Hemmung der EIZ von 16-20% (Abb. 27).

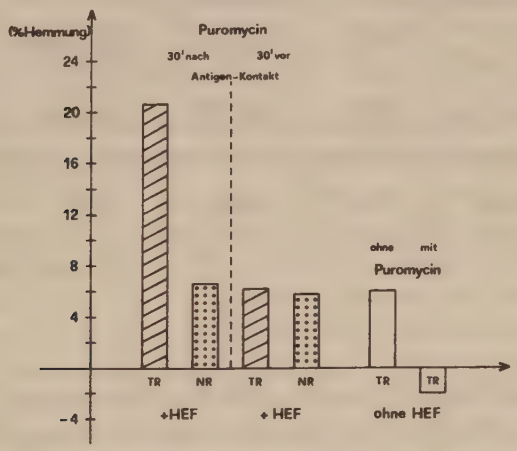

Abb. 27: Abhängigkeit der EMSF-Produktion von der Proteinsynthese

Die Reaktion von Kontrollymphozyten zeigt keine Veränderung durch die Puromycinbehandlung. Überstände, von sensibilisierten Lymphozyten, die ohne Antigenzusatz eine Verlangsamung der EIZ von 2-4% bewirken, zeigen unter Puromycinbehandlung eine Beschleunigung von 2-4%.

f) Verbleib des Antigens nach Inkubation mit Lymphozyten von Tumorratten und Kontrollen

Um etwas über den Verbleib des Antigens zu erfahren, soll versucht werden, Überstände von Tumorratten bzw.

Kontrollen nach Inkubation mit HEF als Antigen im EMT einzusetzen (Tabelle V).

Tabelle V: Stimulation von Lymphozyten mit Überständen von NR und TR nach Inkubation mit HEF

	HEF	Ly.Üb.TR	Ly.Üb.NR
Tumorratte	18%	26-28%	20-22%
Kontrolle	5%	18%	5%

Die durchgeführten Versuche zeigen, daß sowohl Überstände von Tumorratten als auch von Kontrollen nach Inkubation mit HEF das Antigen noch enthalten. Werden Überstände von Normalratten mit Lymphozyten von Tumorratten inkubiert, so werden die EIZ um 20-24% verlangsamt. Da der Überstand von Normalratten im Mittel eine Verlangsamung von 5-6% hervorruft, müssen 16-18% durch die Inkubation mit Lymphozyten von Tumorratten hinzugekommen sein. Dieses entspricht der vollen Stimulation mit HEF. Aber auch Überstände von Tumorratten (nach Inkubation mit HEF) enthalten noch das Antigen, da nach Zugabe von neuen Tumorlymphozyten die Hemmung von 16-18% auf 26-28% steigt. Dies kann nur durch eine erneute Stimulation der Lymphozyten erklärt werden.

g) Einfluß von adhärenten Zellen auf die Produktion von EMSF

Da bei Tumorratten in fortgeschrittenem Stadium die Milz einen stark erhöhten Anteil an adhärenten Zellen aufweist, soll untersucht werden, ob diese einen Einfluß auf die Produktion von EMSF haben. Dazu werden Milzen von Tumorratten mit einem drei Wochen alten Tumor wie folgt aufgearbeitet:

1) Homogenisieren und Waschen der Zellen
2) Homogenisieren und Waschen der Zellen, Wegnahme der adhärenten Zellen durch mehrmaliges Absetzen in Plastik-Petrischalen

Der Gehalt an adhärenten Zellen (Monozyten, Makrophagen bzw. Granulozyten) wird durch Auswerten von Zellausstrichen (Pappenheim-Färbung) grob bestimmt. Die Versuche ergeben keinen Hinweis auf einen Einfluß der adhärenten Zellen auf die EMSF-Produktion (Tabelle VI). Selbst bei einem Gehalt von 20% adhärenten Zellen werden 18-20% Verlangsamung gemessen. Diese Untersuchungen zeigen ebenfalls, daß es einen Suppressionseffekt, wie er bei der PHA-Stimulation in fortgeschrittenem Tumorstadium oft beobachtet wird, im EMT nicht gibt.

Tabelle VI: Einfluß adhärenter Zellen auf die EMSF-Produktion

% Adhärente Zellen	20	12	8	3
Verlangsamung	18	20	19	18

6) Mechanismus des EMT

a) Eigenwirkung von HEF auf die EIZ

Wie schon 1975 von Porzsolt et al. beschrieben, hat das HEF einen nicht unerheblichen Einfluß auf die EIZ. Werden EIZ direkt mit 33µg HEF/ml inkubiert, so kommt es zu einer Verlangsamung der EIZ von 30-35%. Lymphozytenüberstände von Kontrollen zeigen nach Inkubation mit 33µg HEF/ml 4-6% Verlangsamung, von Tumorratten hingegen 16-20%.(Abb. 28).

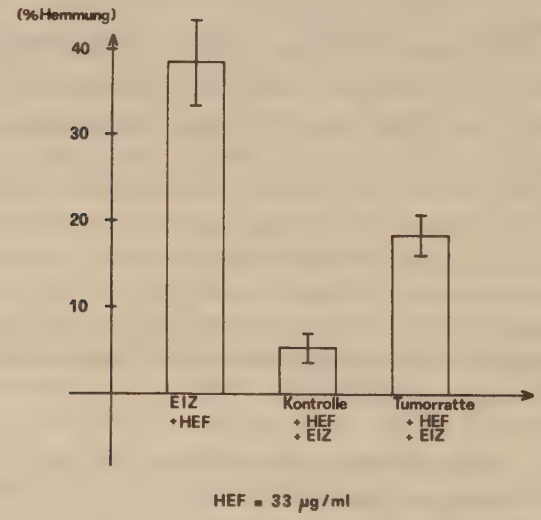

Abb. 28: Eigenwirkung von HEF auf die EIZ im Vergleich zu Überständen von NR und TR

Somit ist eine Differenzierung von Tumorratten und Kontrollen sehr gut möglich. Für den Mechanismus des EMT bieten sich aber zwei Erklärungen an:

1) HEF hat eine unspezifische "slowing"-Komponente, die nach Inkubation mit Lymphozyten "abgebaut" ist, Lymphozyten von Tumorratten produzieren EMSF und

verursachen so eine Verlangsamung der EIZ im Gegensatz zu Lymphozyten von Kontrollen, die diesen Faktor nicht produzieren.

2) Es wird kein EMSF produziert, sondern das HEF wird durch Lymphozyten von Tumorratten nicht so stark abgebaut wie durch Lymphozyten von Kontrollen. Man würde somit lediglich eine verbleibende Restaktivität des HEF messen.

b) Eigenwirkung von KCl-RAC auf die EIZ

Der KCl-Extrakt des Tumors besitzt ebenso wie HEF eine starke Eigenwirkung auf die EIZ (Abb. 29), so daß man die oben aufgeführten Erklärungen auch für den Mechanismus des EMT mit KCl-RAC als Antigen diskutieren kann.

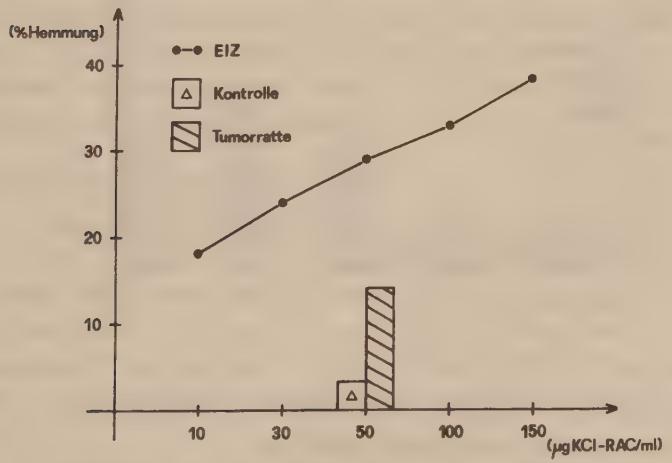

Abb. 29: Eigenwirkung von KCl-RAC auf die EIZ

7) Fraktionierung, Reinigung und Identifizierung der Antigene

a) HEF-Extrakt

Amicon Membran-Filtration

Eine grobe Fraktionierung des HEF-Extraktes wird zunächst mit Hilfe von Amicon Filtrationsmembranen durchgeführt. Die einzelnen Fraktionen werden jeweils mit Lymphozyten von Tumorratten und Kontrollen sowie direkt mit den EIZ inkubiert. Das Ergebnis dieser Untersuchung im EMT zeigt Abbildung 30.

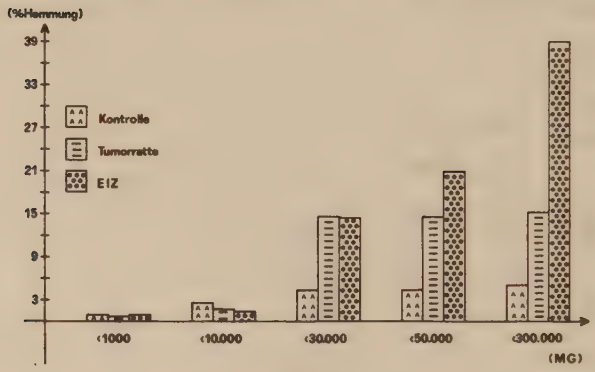

Abb. 30: Fraktionierung des HEF-Extraktes durch Amicon Membran-Filtration

Die Fraktionen kleiner 1.000dund kleiner 10.000d haben keine Wirkung. Lymphozytenüberstände von Tumorratten bzw. Kontrollen zeigen eine maximale Verlangsamung von 3%. Die Fraktion kleiner 30.000d enthält bereits das Antigen. Lymphozytenüberstände von Tumorratten zeigen eine Verlangsamung der EIZ von

14-16%, Überstände von Kontrollen hingegen nur 3-5%. Die direkte Wirkung dieser Fraktion liegt allerdings auch bei 14-18% Verlangsamung.
In den folgenden Fraktionen (kleiner 50.000d und 300.000d) kommt es zu keiner weiteren Steigerung der Reaktion mit Lymphozyten von Tumorratten. Die Reaktion bleibt gleich stark, ebenso die Reaktion mit Lymphozyten von Kontrollen.
Einen sehr starken Anstieg gibt es jedoch bei der direkten Wirkung der einzelnen Fraktionen auf die EIZ. Während die Fraktion kleiner 30.000d eine Verlangsamung von 14-18% hervorruft, kommt es bei der Fraktion kleiner 50.000d zu einer Verlangsamung von 20-24% und bei der Fraktion kleiner 300.000d, die dem Gesamt-Extrakt entspricht, zu einer Verlangsamung von 35-40%. Damit kann mit Sicherheit gesagt werden, daß der HEF-Extrakt störende, unspezifische "slowing"-Substanzen enthält, die nicht mit dem Antigen identisch sind. Letzteres erscheint in der Fraktion kleiner 30.000d und hat damit ein Molekulargewicht zwischen 10.000d und 30.000d.

Ionenaustauscherchromatographie

Um zu sehen, ob es sich bei dem Antigen wirklich um ein basisches Protein handelt, wird der HEF-Extrakt über eine QAE-Sephadex A-50 Säule aufgetrennt. Die basischen Proteine werden gepoolt, über Nacht dialysiert und auf pH 7,2 eingestellt. Nach Elution der sauren Proteine werden diese genauso aufgearbeitet.
7×10^6 Lymphozyten von Tumorratten und Kontrollen werden dann mit steigenden Konzentrationen der beiden Fraktionen inkubiert und der Überstand mit EIZ im Zytopherometer getestet. Das Elutionsprofil der QAE-Säule zeigt Abbildung 31, die Aktivität der Fraktionen im EMT Abbildung 32.
Die antigene Aktivität liegt deutlich in der basischen Fraktion. Als Antigen ergibt sich also bisher ein

basisches Protein mit einem wahrscheinlichen Molekulargewicht von 10.-30.000d.

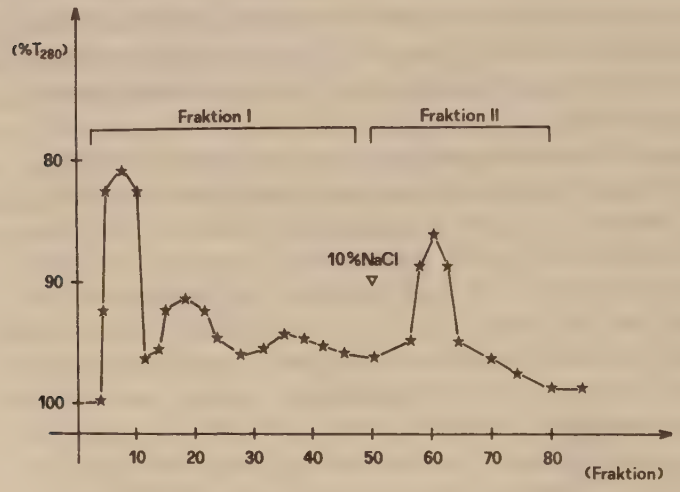

Abb. 31: Fraktionierung von HEF an QAE-Sephadex A-50

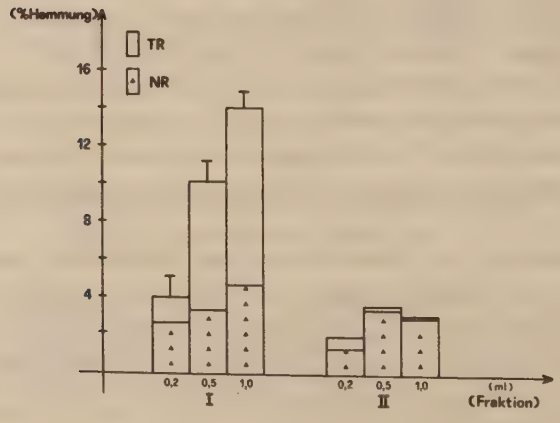

Abb. 32: Testung der bei der QAE-Sephadex A-50-Auftrennung erhaltenen Fraktionen auf Antigenität im EMT

Die eigentliche Reinigung des Antigens erfolgt nun mit Hilfe der Kationenaustauscherchromatographie bzw. der Molekularsiebchromatographie. Als Erstes soll versucht werden, das Antigen mit Hilfe eines Kationenaustauschers zu reinigen. Als Säule wird eine SP-Sephadex C-25 gewählt. Die sauren Proteine werden verworfen, die basischen mit Hilfe eines NaCl-Gradienten eluiert.
Abbildung 33 zeigt das Elutionsprofil sowie die antigene Aktivität der einzelnen Fraktionen in bezug auf den EMT.

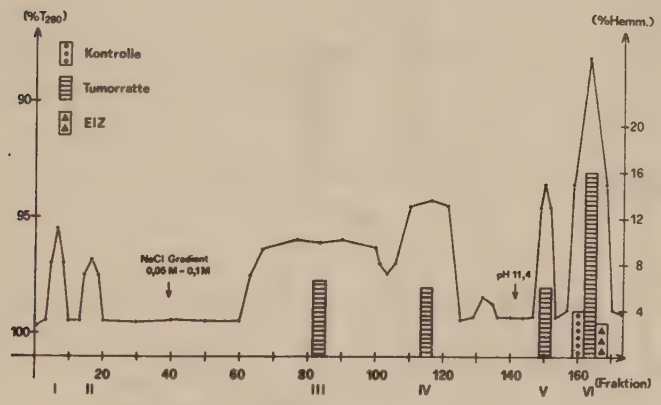

Abb. 33: Fraktionierung von HEF an SP-Sephadex C-25 und Testung der erhaltenen Fraktionen im EMT

Von den getesteten Fraktionen zeigt lediglich Fraktion VI eine deutliche Aktivität im EMT. Die Differenz zwischen der EMSF-Aktivität von Tumorratte und Kontrolle beträgt 12-14%. Entscheidend bei dieser Fraktion ist die direkte Wirkung auf die EIZ. Sie beträgt lediglich 2-4% und ist damit deutlich geringer als die Verlangsamung, die nach Inkubation mit Lympho-

zyten von Tumorratten gemessen wird.

Molekularsiebchromatographie

Der zweite Schritt zur Reinigung des Antigens besteht in der Anwendung der Molekularsiebchromatographie. Als Ausgangsmaterial dienen zwei Fraktionen:

1) die Amicon-Membran-Fraktion kleiner 30.000d
2) die Fraktionen kleiner 30.000d einer Sephadex G-100 Fraktionierung des HEF-Extraktes

Abbildung 34 zeigt zunächst das Elutionsprofil der Sephadex G-100 Fraktionierung von HEF. Als Markerproteine werden BSA, Chymotrypsin und Lysozym eingesetzt.

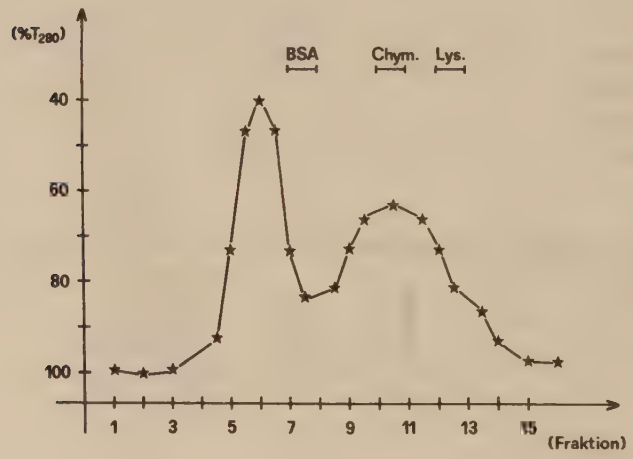

Abb. 34: Fraktionierung von HEF an Sephadex G-100

Die beiden Fraktionen kleiner 30.000d (Sephadex G-100, Amicon) werden zunächst gefriergetrocknet. Der Rückstand wird in 2ml Tris/HCl rekonstituiert und über eine Sephadex G-50 Säule aufgetrennt. Als Markerproteine werden Chymotrypsin und Lysozym eingesetzt. Da die Elutionsprofile beider Fraktionen identisch sind, ist in Abbildung 35 nur ein Elutionsprofil

dargestellt. Die aufgetragenen Fraktionen spalten sich im wesentlichen in zwei Fraktionen auf. Die antigene Aktivität beider Fraktionen wurde genauestens untersucht und ist ebenfalls in Abbildung 35 eingezeichnet.

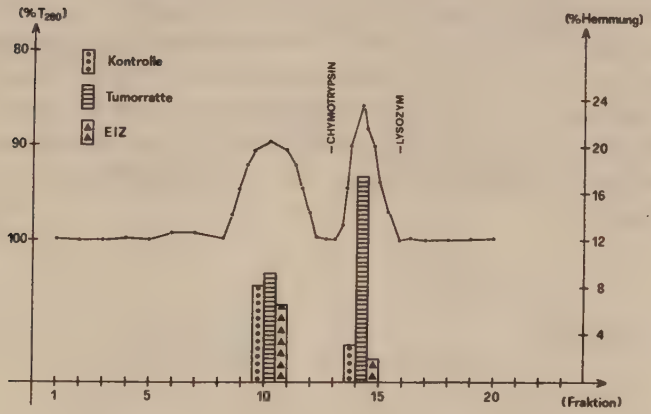

Abb. 35: Auftrennung der Fraktionen kleiner 30.000d (Sephadex G-100, Amicon) an Sephadex G-50 und Testung der Fraktionen auf Antigenität im EMT

Während Peak I keine Differenzierung von Tumorratten und Kontrollen ermöglicht, die gemessenen Werte als auch der direkte Einfluß der Fraktion auf die EIZ schwanken um 8%, ist mit Hilfe von Peak II eine Differenzierung gut möglich. Werden 1,0ml der gewonnenen Fraktion im EMT als Antigenlösung eingesetzt, ergibt sich eine Differenzierung im EMT von Tumorratten und Kontrollen zwischen 14 und 18%. Inkubiert man 1,0ml dieser Fraktion direkt mit $5x10^7$ EIZ, ergibt sich wiederum nur eine Hemmung von 2-4%. Auch hier ist also die Wirkung des Antigens deutlich geringer als

die Hemmung, die nach Inkubation mit Lymphozyten von Tumorratten gemessen wird.

Zur Bestimmung des Molekulargewichts von Peak VI der Ionenaustauscherchromatographie wird eine geeichte Sephadex G-100 Säule verwendet. Das Elutionsprofil zeigt einen einzigen Peak in der Region zwischen Chymotrypsin und Lysozym (ohne Abbildung). Zur genaueren Bestimmung, und um eine eventuelle Identität zwischen Fraktion VI der Ionenaustauscherchromatographie und Fraktion II der Sephadex G-50 Fraktionierung zu überprüfen, werden beide Fraktionen über eine Sephadex G-50 Säule gegeben. Das Elutionsprofil und das Molekulargewicht sind aus Abbildung 36 zu entnehmen.

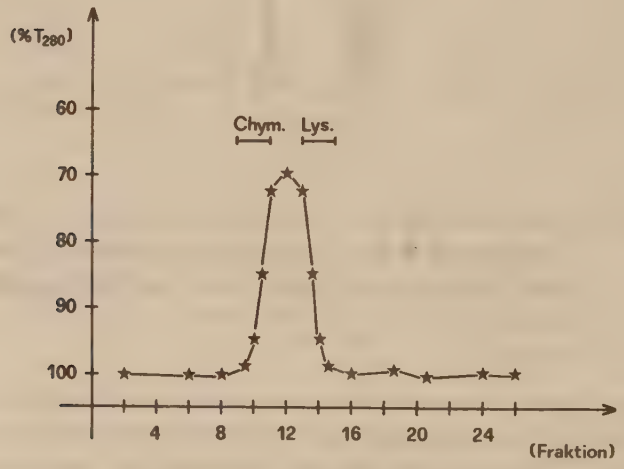

Abb. 36: Molekulargewichtsbestimmung (von Peak VI der Ionenaustauscherchromatographie und Peak II der Sephadex G-50 Fraktionierung von HEF) an Sephadex G-50

Die Proteine beider Fraktionen eluieren in einem gemeinsamen Peak, der zwischen den Markerproteinen Chymotrypsin und Lysozym liegt. Durch halblogarithmische Auswertung ergibt sich ein Molekulargewicht von 16.-20.000d. Außerdem kann aus diesem Elutionsprofil geschlossen werden, daß Peak VI und II vermutlich identische Proteine enthalten.
Eine schematische Übersicht der Fraktionierung und Reinigung von HEF ist nochmals in Abbildung 37 wiedergegeben.

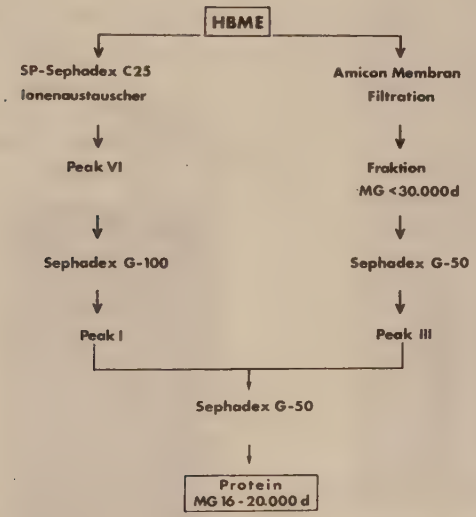

Abb. 37: Schematische Übersicht der Fraktionierung von HBME (Humaner basischer Myelinextrakt)

SDS-Polyacrylamid-Diskelektrophorese

Um die Reinheit des gewonnenen HEF-Proteins nachzuweisen, und um weitere Informationen über die Zusammensetzung des HEF-Extraktes zu bekommen, soll versucht werden, den Extrakt in einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese darzustellen. Bei der zunächst durchgeführten Flachbettelektrophorese ergeben sich erhebliche Schwierigkeiten in der Darstellung der basischen Proteine. Es wird daher in den folgenden

phorese durchgeführt. Dazu wird eine 0,5%ige filtrierte HEF-Lösung hergestellt. Vor dem Auftragen werden die Proben eine Minute in einer SDS-Sucrose-Lösung gekocht. Die Laufzeit beträgt 6-7 Stunden bei einer Stromstärke von 8mA/Röhrchen. Abbildung 38 zeigt die Darstellung von HEF in der SDS-PAGE bei einem Auftragsvolumen von 20, 40 und 60µl.

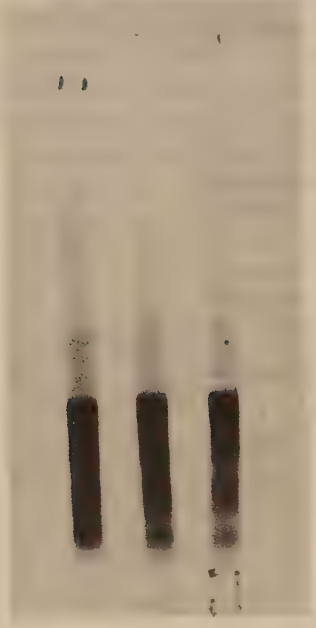

Abb. 39:
Darstellung von HEF in der SDS-PAGE im Vergleich zu BSA, Chymotrypsin und Lysozym
Gel 1: BSA u. Lysozym
Gel 2: Chymotrypsin
Gel 3: HEF-Gesamt

Abb. 38:
Darstellung von HEF in der SDS-PAGE

Abbildung 40 zeigt die Darstellung des gereinigten HEF-Proteins in der SDS-PAGE im Vergleich zu Chymotrypsin und Lysozym.

Abb. 40: Darstellung des gereinigten HEF-Proteins in der SDS-PAGE
Gel 1: Lysozym
Gel 2: Chymotrypsin
Gel 3: HEF-rein

Wie aus Abbildung 38 und 39 hervorgeht, lassen sich beim HEF-Extrakt insgesamt neun Banden ausmachen, die in einem Molekulargewichtsbereich von 150.000d bis kleiner 14.000d liegen. Die Hauptbande befindet sich in einem Molekulargewichtsbereich von 18.-20.000d. In Abbildung 40 ist das gereinigte HEF-Protein dargestellt. Es bildet eine einzige Bande im Bereich von 16.-20.000d und stellt damit ein reines Protein dar.

Um die Wirkungsweise dieses gereinigten HEF-Proteins im EMT nochmals abzusichern, werden mit diesem Antigen Versuchsreihen mit Tumorratten und Kontrollen durchgeführt. Zur späteren Untersuchung des EMSF ist es von größter Bedeutung, daß das eingesetzte Antigen keine direkte Wirkung auf die EIZ besitzt. Abbildung 41 zeigt die Untersuchungsergebnisse im EMT unter Verwendung des gereinigten Antigens.

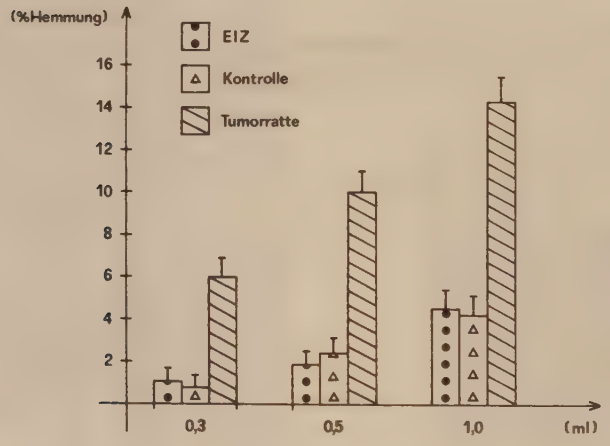

Abb. 41: Antigene Wirkung des gereinigten HEF im EMT

Bei Kontrollen kommt es zu einer Reaktion, die dem Eigenwirkung des Antigens entspricht, d.h. derjenigen Wirkung, die das Antigen selbst auf die EIZ ausübt. Bei Tumorratten hingegen kommt es zu einer dosisabhängigen Reaktion; mit zunehmender Antigenmenge vergrößert sich die Differenz der Verlangsamung zwischen Tumorratte und Kontrolle. Bei einem Einsatz von 1ml Antigenlösung erreichen Lymphozytenüberstände von Tumorratten einen Wert von 20-22% im EMT, Kontrollen hingegen nur von 6-8%. Die Eigenwirkung des Antigens

beträgt ebenfalls nur 6-8% und liegt damit 14% unterhalb des Wertes von Tumorratten. Damit kann das Antigen (wie zu Beginn der Untersuchungen als eine Möglichkeit erwähnt) nicht mehr für die Hemmung bei Tumorratten verantwortlich sein. Mit dem Einsatz des gereinigten Antigens sollen später Untersuchungen zur Natur des EMSF durchgeführt werden.

b) KCl-Extrakt R3230AC

Wie bereits erwähnt, übt auch der KCl-Extrakt einen starken Einfluß auf die EIZ aus. Die folgenden Untersuchungen sollen klären, ob es möglich ist, auch den KCl-Extrakt in Antigen und unspezifische "slowing"-Substanzen aufzutrennen. Dazu werden 50mg KCl-Extrakt (Proteingehalt) in Tris/HCl-Puffer gelöst und über eine Sephadex G-150 Säule aufgetrennt. Das Elutionsprofil ist in Abbildung 42 wiedergegeben.

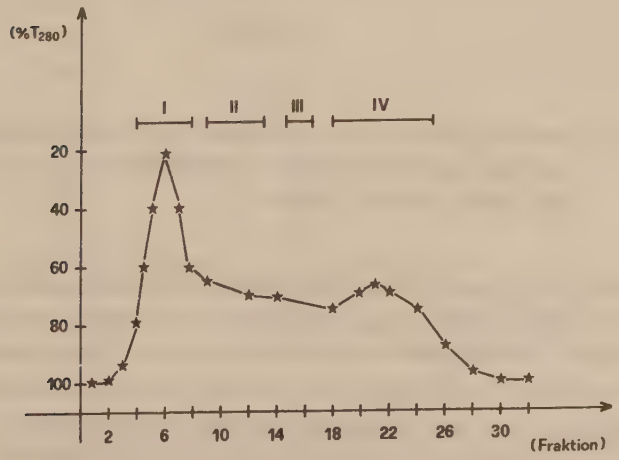

Abb. 42: Fraktionierung von KCl-RAC an Sephadex G-150

Das Eluat wird in vier Fraktionen unterteilt. Steigende Konzentrationen der einzelnen aufgearbeiteten Fraktionen werden dann mit Lymphozyten von Tumorratten und Kontrollen bzw. direkt mit den EIZ getestet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 43 wiedergegeben.

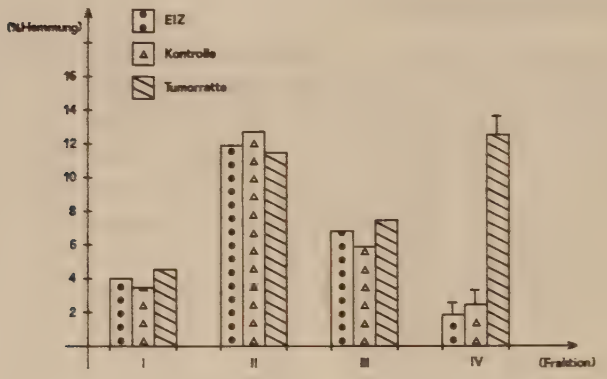

Abb. 43: Testung der durch Sephadex G-150 Auftrennung des KCl-RAC-Extraktes erhaltenen Fraktionen auf Antigenität im EMT

Fraktion I, II und III zeigen keine antigene Aktivität im EMT. Alle drei Fraktionen besitzen aber einen stark verlangsamenden Effekt auf die EIZ, wenn man sie direkt mit ihnen inkubiert. Nach Inkubation mit Lymphozyten von Tumorratten bzw. Kontrollen kommt es zu keinen signifikanten Unterschieden in der Beeinflussung der EIZ. Die gefundenen Werte entsprechen denen, die die Fraktionen direkt auf die EIZ ausüben. Anders jedoch Fraktion IV: sie zeigt eindeutig antigene Eigenschaften. Der direkte Ein-

fluß auf die EIZ ist gering und entspricht dem Wert, der auch nach Inkubation mit Lymphozyten von Kontrollen gemessen wird. Werden jedoch Lymphozyten von Tumorratten mit dieser Fraktion inkubiert, kommt es zu einem signifikanten Anstieg der Verlangsamung, die um 8-14% höher liegt, als die Werte der Kontrollen. Damit kann auch das Antigen innerhalb des KCl-Extraktes von unspezifischen Substanzen getrennt werden. Die bei Tumorratten gemessene Hemmung kann nicht von dem Antigen verursacht worden sein, es muß ein neuer Faktor von den Lymphozyten abgegeben worden sein. Zur weiteren Chrakterisierung des Antigens wird die Fraktion IV über eine geeichte Sephadex G-50 Säule aufgetrennt und so die Reinheit sowie das ungefähre Molekulargewicht des Antigens bestimmt (Abbildung 44)

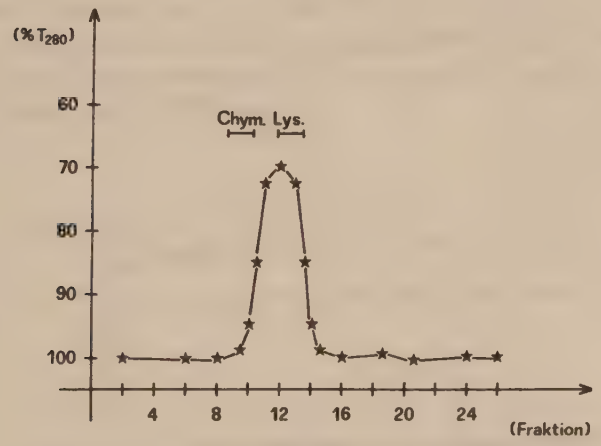

Abb. 44: Molekulargewichtsbestimmung des (im EMT aktiven) gereinigten KCl-RAC-Antigens an Sephadex G-50.

Fraktion IV eluiert auch bei einer Sephadex G-50 Fraktionierung in einem einzigen sauberen Peak.

Anhand der Markerproteine kann das Molekulargewicht auf 14.-16.000d bestimmt werden. Es ist damit etwas kleiner als das im EMT aktive Antigen des HEF-Extraktes.

8) Untersuchung von EMSF

a) Kinetik der EMSF-Produktion

Mit dem gereinigten HEF-Protein, das keinen störenden Einfluß mehr auf die EIZ hat, soll die Produktion von EMSF untersucht werden (Abbildung 45).

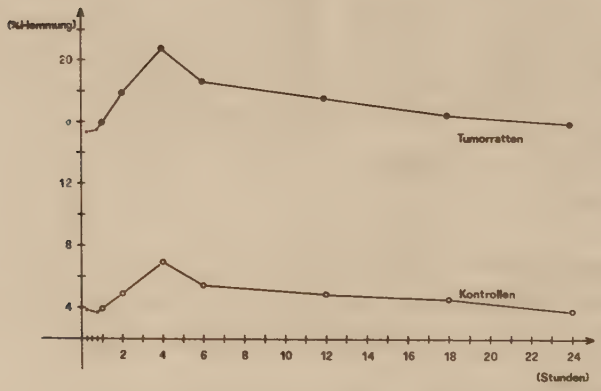

Abb. 45: Abhängigkeit der EMSF-Produktion von der Inkubationszeit (Lymphozyten + Antigen)

Bereits nach 15 Minuten lassen sich mit Überständen von Tumorratten Hemmungen der EIZ bis zu 16% erzielen. Die EMSF-Aktivität steigt dann geradlinig an und erreicht bei einer Inkubationszeit von vier Stunden ein Optimum. Bis zu 24 Stunden kommt es zu einem leichten

Abfall der Reaktivität, die aber nach 24 Stunden immer noch zu einer Hemmung der EIZ von 12% führt. Überstände von Kontrollen zeigen überraschenderweise in abgeschwächter Form dieselbe Reaktionskinetik, allerdings liegen alle Werte im Bereich der Schwankungsbreite von gesunden Tieren. Die größte Hemmung liegt nach vier Stunden bei 6-8%. Eine Differenzierung von Tumorratten und Kontrollen ist somit bereits nach 30 Minuten mit Sicherheit möglich. Danach kommt es zu keiner wesentlichen Änderung der Differenz zwischen der Hemmung die von Tumorratten bzw. Kontrollen erreicht wird. Sie beträgt im Mittel 14-16%.

b) Bestimmung des Molekulargewichts

Mit Hilfe des gereinigten HEF-Antigens soll nun eine Charakterisierung von EMSF versucht werden.
Zur ungefähren Bestimmung des Molekulargewichts wird zunächst ein EMSF-Pool durch Amicon-Membranen grob aufgetrennt (Abbildung 46).

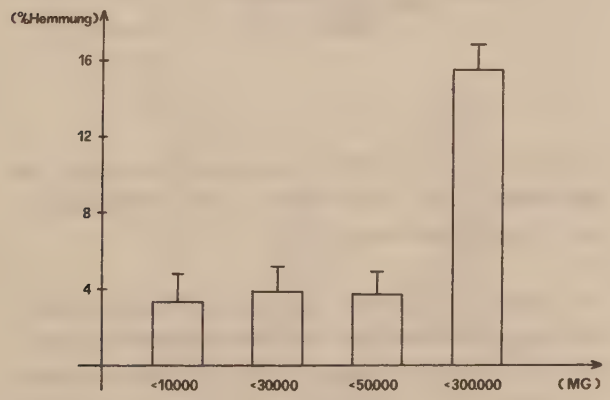

Abb. 46: Auftrennung von EMSF-haltigem Überstand durch Amicon Membranen

Abbildung 46 zeigt, daß EMSF erst oberhalb von 50.000d erscheint. Damit gibt es zum ersten Mal einen direkten Hinweis auf das Vorliegen eines Faktors, der unabhängig vom Antigen (MG 16.-20.000d) die EIZ verlangsamt.
Zur genaueren Bestimmung des Molekulargewichts werden 300ml Überstand von Tumorratten eingeengt und über eine geeichte Sephadex G-100 Säule aufgetrennt. Das Elutionsprofil sowie die EMSF-Aktivität der einzelnen Fraktionen ist in Abbildung 47 dargestellt.

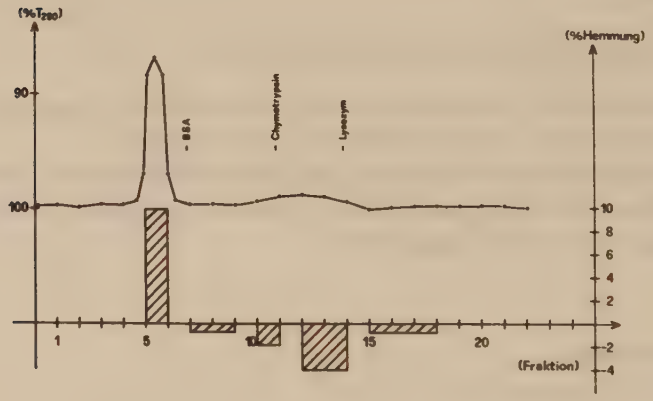

Abb. 47: Auftrennung von EMSF-haltigem Überstand an Sephadex G-100 und Testung der Fraktionen auf ihren EMSF-Gehalt

Es kommt zur Ausbildung eines scharfen Peaks, der noch vor BSA eluiert und von den untersuchten Fraktionen als einzige eine Hemmung der EIZ hervorruft. Es kommt zu einer Verlangsamung der EIZ von 7-10%, demgegenüber bewegen sich die Werte der anderen untersuchten Fraktionen um die Null-Linie.
Das Molekulargewicht des EMSF läßt sich auf über

80.000d bestimmen und entspricht damit dem Ergebnis der Amicon-Membranfiltration. Außerdem läßt sich der gefundene EMSF klar vom eingesetzten Antigen abtrennen.

c) Rückgewinnung des Antigens aus HEF-induzierten Überständen von Tumorratten-Lymphozyten

Geht man von den oben gemachten Untersuchungsergebnissen aus, daß Überstände von Tumorratten-Lymphozyten noch antigene Wirkung haben, so müßte sich das eingesetzte Antigen zurückgewinnen lassen. Um diese Vermutung zu bestätigen, werden die Fraktionen mit einem Molekulargewicht kleiner 25.000d gepoolt und gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wird in Hanks' rekonstituiert und im EMT als Antigen eingesetzt. Abbildung 48 zeigt, daß es tatsächlich möglich ist, das Antigen aus dem Überstand von Tumorratten-Lymphozyten zurückzugewinnen.

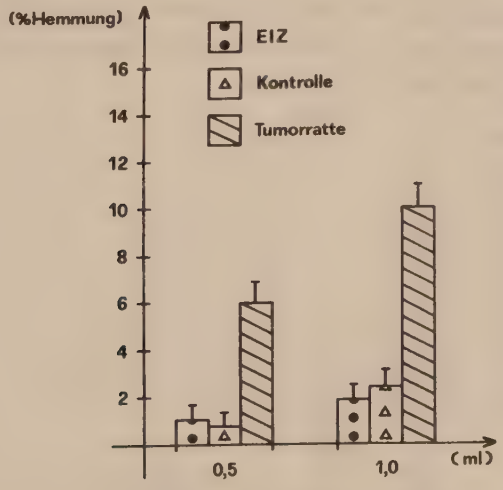

Abb. 48: Nachweis der Wirkung des aus HEF-induzierten Überständen von Tumorratten-Lymphozyten zurückgewonnenen Antigens

Tumorratten zeigen eine deutliche Hemmung gegenüber Kontrollen. Die gemessenen Werte liegen außerdem wesentlich höher als es die direkte Wirkung des Antigens auf die EIZ zulassen würde. Es ist also erneut zur Bildung von EMSF gekommen, und der Nachweis des Antigens ist damit erbracht.

d) Hitzestabilität von EMSF

Zur Untersuchung der Hitzestabilität werden gleiche Teile von EMSF-haltigem Überstand entweder bei 4°C im Kühlschrank aufgehoben, oder aber für 30 Minuten bei 56°C im Wasserbad inkubiert. Es kann gezeigt werden, daß EMSF hitzestabil ist und keinen Aktivitätsverlust gegenüber Kontrollen nach 30 Minuten bei 56°C aufweist.

e) Bestimmung der Trypsinempfindlichkeit von EMSF

Die Aktivität EMSF-haltiger Überstände in bezug auf eine Verlangsamung der EIZ läßt sich durch Trypsin-Behandlung zerstören. Abbildung 49 zeigt eine Zusammenfassung von drei Versuchen.

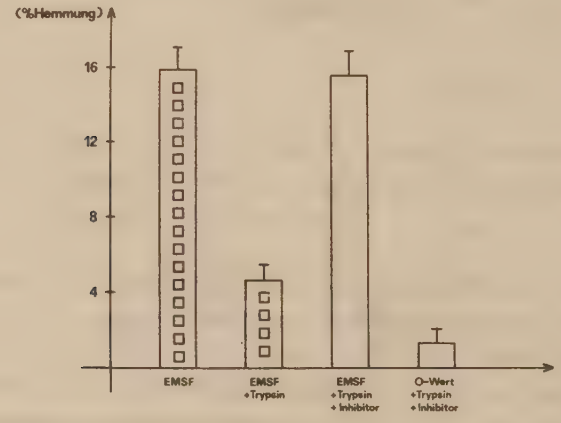

Abb. 49: Trypsinempfindlichkeit von EMSF

Die erzielte EIZ-Hemmung mit Überständen, die nicht mit Trypsin behandelt werden, beträgt im Mittel 18-20%. Überstände von Tumorratten-Lymphozyten, die mit Trypsin behandelt werden, führen jedoch nur zu einer Verlangsamung der EIZ von 4-6%. Als eine weitere Kontrolle wird inaktiviertes Trypsin mit EMSF inkubiert. Diese Behandlung führt zu keiner Zerstörung der EMSF-Aktivität. Trypsin und Trypsin-Soybean-Inhibitor haben keine Eigenwirkung auf die EIZ.

f) 6 M Harnstoffanalyse von EMSF

Gereinigter EMSF mit einem Molekulargewicht von größer 80.000d wird unter 6 M Harnstoffzusatz über eine Sephadex G-100 Säule aufgetrennt. Abbildung 50 gibt das Ergebnis dieser Untersuchungen wieder.

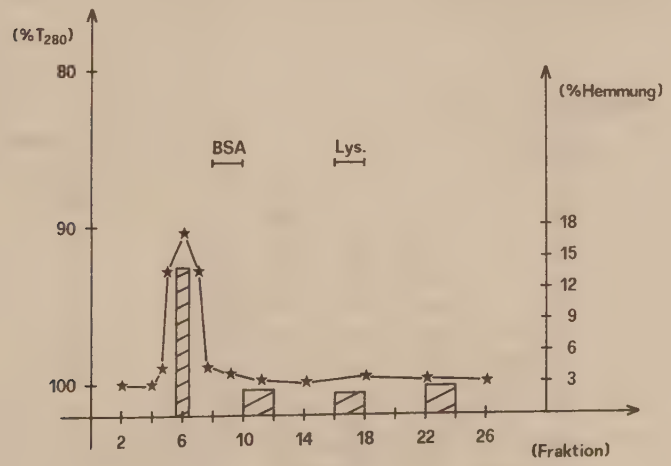

Abb. 50: 6 M Harnstoffstabilität von EMSF
Fraktionierung des gereinigten EMSF an Sephadex G-100 unter 6 M Harnstoff

EMSF eluiert auch unter 6 M Harnstoffzusatz vor BSA und zeigt keine Aufspaltung des Peaks. Durch Testung der Fraktion mit EIZ kann die EMSF-Aktivität nachgewiesen werden.

9) Induktion von EMSF durch Con A

Es soll versucht werden, EMSF durch Con A-Stimulation der Lymphozyten zu produzieren. Dazu werden zunächst Vorversuche mit Lymphozyten von Tumorratten unternommen. $2x10^6$ Milzzellen werden mit steigenden ConA-Konzentrationen inkubiert, die Überstände entsprechend den Konzentrationen gepoolt, und 3ml Überstand mit $5x10^7$ EIZ inkubiert. Die Messung der EIZ im Zytopherometer zeigt, daß mit zunehmender Con A-Konzentration die Überstände eine größere Hemmung der EIZ hervorrufen; es muß also zu einer dosisabhängigen Produktion eines "slowing"-Faktors gekommen sein (Abbildung 51).

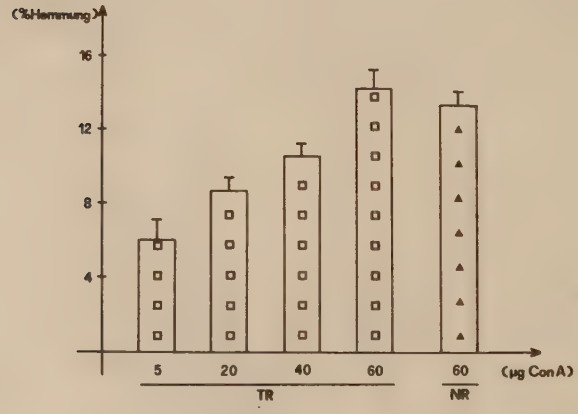

Abb. 51: EMSF-Aktivität in Con A-induzierten Lymphozytenüberständen von Tumorratten und Kontrollen

Überstände von Lymphozyten, die mit 60ug Con A/ml inkubiert werden, führen zu einer Verlangsamung der EIZ bis zu 14%.
Lymphozyten unbehandelter Tiere werden daraufhin ebenfalls mit 60ug Con A/ml inkubiert. Wie Abbildung 51 zeigt, kommt es auch hier zur Freisetzung eines "slowing"-Faktors, der die EIZ bis zu 14% verlangsamt.
Alle getesteten Con A-Konzentrationen haben keinen Einfluß auf die EIZ, sodaß unspezifische Nebenwirkungen ausgeschlossen werden können.
Der oben beschriebene Versuchsansatz wird nun verwendet, um sowohl von sensibilisierten Lymphozyten als auch von Lymphozyten unbehandelter Tiere Con A-induzierten "slowing"-Faktor zu isolieren.
Dazu werden jeweils 800ml Überstand gesammelt, eingeengt und über eine Sephadex G-100 Säule aufgetrennnt.
Nach Aufarbeitung der Fraktionen werden diese mit EIZ auf ihren Gehalt an "slowing"-Faktor geprüft.

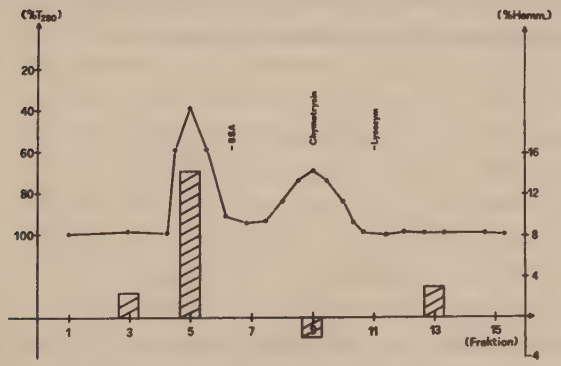

Abb. 52: Fraktionierung von Con A-induzierten Lymphozytenüberständen an Sephadex G-100 und Testung der erhaltenen Fraktionen auf ihren

Im Gegensatz zu Überständen, die durch Inkubation von sensibilisierten Lymphozyten mit HEF gewonnen werden, kommt es bei der Auftrennung von Con A-induzierten Überständen zur Ausbildung von zwei scharfen Peaks. Peak I entspricht im Molekulargewicht exakt dem HEF-induzierten EMSF und besitzt als einzige Fraktion EMSF-Aktivität.
Peak II hat ein Molekulargewicht von 24.500d, besitzt aber keine EMSF-Aktivität. Alle anderen getesteten Fraktionen führen ebenfalls zu keiner Verlangsamung der EIZ.
Das Elutionsprofil der Überstände von Tumorratten und Kontrollen ist identisch, so daß in Abbildung 52 nur eine Kurve dargestellt ist.
Zum Schluß der Untersuchungen wird Peak I auf Hitzestabilität sowie auf Trypsinempfindlichkeit getestet. Es kann gezeigt werden, daß der Con A-induzierte EMSF wie der HEF-induzierte EMSF hitzestabil aber Trypsin-empfindlich ist.
Die Ergebnisse zeigen, daß sich sowohl mit HEF als auch mit Con A ein Faktor aus Lymphozyten isolieren läßt, der EMSF-Aktivität besitzt. Nach den hier durchgeführten Versuchen kann man postulieren, daß es sich um identische Faktoren handelt.

IV) Diskussion

Wie bereits erwähnt, ist der Wert des EMT trotz intensiver klinischer Untersuchungen bis heute in der Diskussion.
Es ist auf der einen Seite nicht geklärt, ob der EMT als Test zur Früherkennung von Krebs geeignet ist, und auf der anderen Seite, wie die Lymphozytensensibilisierung nach erfolgreicher Behandlung des Tumors verläuft. Ebenfalls ist es bis heute nicht geklärt, ob es zwischen dem ersten Auftreten der Sensibilisierung der Lymphozyten und den späteren Stadien, in denen der Tumor klinisch manifest wird, eine Kinetik der Lymphozytensensibilisierung in Abhängigkeit zur Manifestation des Tumors gibt.
Der Mechanismus des EMT, insbesondere mit HEF als Antigen, ist bis heute umstritten. Die starke Eigenwirkung, die das Antigen auf die EIZ ausübt, läßt es als unwahrscheinlich erscheinen, daß zusätzlich ein Faktor gebildet wird, der die EIZ über das Maß des HEF hinaus verlangsamt. So wird immer wieder diskutiert, daß man es nicht mit der Messung eines Lymphokins zu tun hat, sondern mit der unterschiedlichen Fähigkeit von Lymphozyten, HEF abzubauen. Während Lymphozyten von Kontrollen die Wirkung des HEF bis auf 4% Verlangsamung abbauen sollen, nimmt man bei Lymphozyten von Tumorpatienten eine geschwächte Reaktion an, so daß eine Hemmung von 20% zurückbleibt. Diese Theorie wurde zuletzt von Dyson und Corbett (1978) unterstützt. Sie konnten zwar Normalpersonen und Tumorpatienten auf Grund des EMT signifikant unterscheiden, fanden jedoch, daß die Hemmung der EIZ durch Lymphozytenüberstände von Tumorpatienten nie größer war, als die Hemmung, die HEF allein auf den EIZ hevorrufen würde.
Fish ging 1977 noch einen Schritt weiter,und sprach dem EMT bzw. MEM zusätzlich die immunologische Basis ab. Er schlug einen Mechanismus vor, der auf unspezi-

fischen morphologischen und biochemischen Veränderungen beruht, die während der Aufarbeitung der Lymphozyten auftreten sollen. Bei der anschließenden Inkubation wird das Antigen seiner Meinung nach durch elektrostatische Kräfte an die Lymphozyten gebunden, um dann durch verschiedene Umstände, z.B. Proteasen, abgebaut zu werden, oder gespalten zu werden. Diese Prozesse seien bei Tumorpatienten anders als bei Kontrollen, und ein oder mehrere peptische Fragmente des HEF sollen seiner Meinung nach dann den von Field und Caspary proklamierten MSF darstellen.

Neben diesen mehr theoretischen Fragestellungen stehen aber auch technische Probleme bei der Durchführung des MEM im Vordergrund. Dazu gehören u.a. die Indikatorzellen, als auch die Tatsache, daß sowohl der MEM als auch der EMT bis heute nicht in einer standardisierten Form vorliegen. Insbesondere die von den verschiedenen Untersuchern eingesetzten Antigene sind noch nicht standardisiert. Dadurch sind auch keine Vergleiche der einzelnen Laboratorien möglich. Hinzu kommt, daß auch die Ermittlung des O-Werts nicht einheitlich ist, so daß immer noch mit verschiedenen Bezugsgrößen gearbeitet wird.

A) Indikatorzellen

Im Zusammenhang mit den technischen Problemen mag ein großer Nachteil in der Verwendung von Meerschweinchen-Peritoneal-Exudat-Makrophagen als Indikatorzellen im MEM liegen. Die Gewinnung dieser Indikatorzellen erfordert einen nicht unerheblichen Aufwand sowie eine gewisse Erfahrung und Training. Bei den durch Reizung mit Paraffinoel gewonnenen Zellen handelt es sich um inhomogene, d.h. in der Größe unterschiedliche Makrophagenpopulationen, die mit einer stark wechselnden Zahl von Oeltröpfchen beladen sind, (Shenton et al. 73) und mit 15-20% Granulozyten bzw. Lymphozyten vermischt sind. In ihren Untersuchungen konnten Shenton et al..

die Makrophagen auf Grund verschiedener Kriterien in sieben verschiedene Gruppen einteilen. Dabei gab es nur eine Gruppe, die in bezug auf das Wanderungsverhalten im elektrischen Feld Homogenität und eine geringe Standardabweichung zeigte.
Es erfordert also eine große Erfahrung und Übung von Seiten des Untersuchers , die "richtigen" Makrophagen bei der Messung im Zytopherometer herauszusuchen.

Aber es sind noch weitere Probleme mit der Verwendung von Meerschweinchen-Makrophagen verbunden. Um eine MLC-ähnliche Reaktion gegenüber den humanen Lymphozyten zu vermeiden, müssen die Makrophagen bestrahlt werden (Field, Caspary 1970). Außerdem müssen die Makrophagen zunächst auf eine Spontanreaktivität gegenüber HEF oder PPD getestet werden. Um den Test durchführen zu können, muß ebenfalls die Möglichkeit einer optimalen Tierhaltung gegeben sein. Dabei muß streng auf möglichst sterile Bedingungen geachtet werden, nur wenige kranke Tiere können alle anderen für den Test unbrauchbar machen. Bei der Durchführung von Versuchen sollten Kontrollen möglichst in einem anderen Raum untergebracht werden; nicht zuletzt muß die Nahrung ausgewogen sein, da z.B. Vitaminmangel zu kleinen Makkrophagen und oft zu einem blutigen Exudat führt.
Um diese Nachteile zu umgehen, versuchten Porzsolt et al. (1975) andere Indikatorzellen einzusetzen. Tatsächlich stellte sich heraus, daß tannierte und Sulfosalicylsäure stabilisierte Schafserythrozyten (EIZ) anstelle von Makrophagen als Indikatorzellen eingesetzt werden können. Damit hatte man eine Indikatorzelle zur Hand, die in großen Mengen reproduzierbar hergestellt werden kann, und die eine große Homogenität in bezug auf Größe und Wanderungsverhalten im elektrischen Feld zeigt. Jetzt können alle Zellen innerhalb der stationären Ebene zur Messung herangezogen werden, und die Beurteilung der "richtigen"

Indikatorzellen entfällt.
Damit war eine wesentliche Erleichterung für den Test eingeführt, die es ermöglicht, den Test schneller zu erlernen als bisher und ihn auch wesentlich leichter durchführen zu können. Der Einsatz von EIZ konnte von anderen Arbeitsgruppen bestätigt werden: (Douwes et al. 1976, Tautz et al. 1977, Nitschke et al. 1977, Harlos u. Weiss 1977, Dyson u. Corbett 1978).

Im direkten Vergleich von Makrophagen und tannierten Erythrozyten konnten Shenton et al. 1977 zeigen, daß die untersuchten Parameter einander entsprechen, und daß die tannierten Erythrozyten ein gleichwertiger Ersatz für die Makrophagen sind, der Test jedoch wesentlich einfacher mit Erythrozyten als Indikatorzellen durchzuführen ist.
In der vorliegenden Arbeit wurde außerdem eine Fernseh-Video Anlage benutzt. Die Messung der EIZ bzw. Makrophagen erfolgt normalerweise durch ein Binokulartubus mit eingelassenem Netzmikrometer. Bei der Video-Anlage wird das mikroskopische Bild sowie das Netzmikrometer auf einen neben dem Zytopherometer stehenden Monitor (43cm ø) übertragen, auf dem nun die Wanderung der EIZ sehr gut verfolgt werden kann. Da der Abstand der Gitterlinien vergrößert abgebildet ist, können die Messungen genauer durchgeführt werden, außerdem kommt es bei längerem Messen nicht zu einer Ermüdung des Beobachters.

B) O-Wert

Bei der Durchführung des EMT ist der O-Wert oder Standard-Wert von entscheidender Bedeutung. Da in den einzelnen Laboratorien verschiedene O-Werte benutzt werden, führt dies ebenfalls zu einer Verwirrung bei der Beurteilung der Ergebnisse.
In dieser Arbeit wurden 3ml RPMI ohne Zusatz als O-Wert verwendet, um damit ein relatives Maß für die Beweglichkeit der Erythrozyten zu haben. Als weitere Kontrolle wurden Lymphozytenüberstände ohne Antigenzu-

satz eingesetzt, um damit ein Maß für die Eigenreaktivität oder Spontanreaktivität der Lymphozyten zu haben.
Die Wirkung des Antigens läßt sich in der bisher durchgeführten Art nur sehr schwer bestimmen. Verschiedene Gruppen benutzen als O-Wert Überstände von Lymphozyten, die zunächst ohne Antigen inkubiert werden, dann aber nach dem Abzentrifugieren der Lymphozyten mit HEF rekonstituiert werden. Diese O-Werte sind jedoch falsch, da sie der Forderung nach Testung des Antigens nur theoretisch entsprechen, in der Praxis jedoch eine verfälschte Situation wiedergeben.

Wie in dieser Arbeit gezeigt wird, besteht der HEF-Extrakt aus vielen verschiedenen Proteinen, von denen nur eins als Antigen wirkt, die anderen aber z.T. starke unspezifische Wirkungen auf die EIZ ausüben. Während der Inkubation mit Lymphozyten kann es jedoch zu Veränderungen der Proteinzusammensetzung des HEF-Extraktes kommen, z.B. durch unspezifische Absorption der Proteine an die Lymphozyten. Die Tatsache, daß HEF allein bei einer Konzentration von 33ug HEF/ml eine Verlangsamung der EIZ von 35-40% verursacht (Abbildung 28), nach Inkubation mit Lymphozyten von Kontrollen auf 4% abgeschwächt wird (Abbildung 28), und andererseits das Antigen noch im Überstand vorhanden ist (Abbildung 48), deuten darauf hin,daß die unspezifischen Proteine während der Inkubation mit Lymphozyten in der Tat eine Veränderung erfahren, z.B. abgebaut oder absorbiert werden, das Antigen jedoch unverändert aus der Inkubation mit Lymphozyten hervorgeht.
Gibt man nun zu einem Überstand von Lymphozyten, die ohne Antigen inkubiert worden sind, rekonstituierend den HEF-Extrakt hinzu, so sind Proteine des HEF-Extraktes im Überstand enthalten, die die EIZ unspezifisch beeinflussen. Ein Teil dieser Proteine ist jedoch im Überstand von Lymphozyten, die mit HEF inkubiert worden sind, gar nicht mehr vorhanden. Die Zusammensetzung der Proteine ist also eine ganz an-

dere und kann daher nicht miteinander verglichen werden. Das Antigen darf nur in reiner Form dem Überstand als Kontrolle hinzugegeben werden. Wie gezeigt werden konnte, hat das Antigen keine Wirkung auf die EIZ.
Ein O-Wert bestehend aus 3ml RPMI und 33ug HEF/ml würde dieselben Nachteile haben wie ein mit HEF rekonstituierter O-Wert.
Geht man davon aus, daß die beste Kontrolle ein Vergleich von Tumorpatient und Nicht-Tumorpatient ist, so stellt der O-Wert wiederum nur ein relatives Maß dar. Durch eine Verschiebung der Null-Linie würden sich zwar die einzelnen Werte verändern, der Abstand zwischen Tumorpatienten und Kontrollen wäre jedoch gleich. Da jedoch gerade in der Humanmedizin solch ein Vergleich nicht täglich durchgeführt werden kann, ist ein definierter O-Wert bzw. Standardwert sehr wichtig.

C) Ratten-Tumormodell

Viele der bisher angeschnittenen Fragen könnten mit Hilfe eines Tiermodells besser und genauer untersucht werden. Bis heute gibt es jedoch nur relativ wenige Untersuchungen, in denen ein Tiermodell experimentelle Grundlage war, obwohl sich dadurch viele Vorteile ergeben würden: das Tumorwachstum kann gesteuert werden, es ist eine große Anzahl sensibilisierter Lymphozyten vorhanden, die nicht nur aus dem peripheren Blut, sondern auch aus anderen lymphatischen Organen, wie Milz und Lymphknoten, gewonnen werden können. Die Resultate sollten beliebig reproduzierbar sein; außerdem kann der Einfluß von Metastasen durch Amputation des Primärtumors untersucht werden. Daneben besteht die Möglichkeit, beliebig viele Kontrollen mitzuführen, z.B. Tumorratten immer mit gesunden Ratten vergleichen zu können.
Zur Untersuchung von Tumoren und deren Metastasierung

wäre es wünschenswert, ein Tiermodell zu besitzen, das den klinischen Tumoren so weit wie möglich gleicht. Viele Tumormodelle (z.B. für Brustkrebs) bestehen aus induzierten Tumoren (chemisch oder durch Viren), die meistens eine gute Antigenität besitzen, im Gegensatz zu Tumoren mit spontaner Herkunft.
In bezug auf die Metastasierung wäre es wichtig, einen Tumor zu besitzen, der sowohl lymphogen als auch hämatogen metastasiert. Zudem sollte es ein syngener, transplantierbarer und in seiner Anwendung reproduzierbarer Tumor sein.
In dieser Arbeit wurde mit einem spontanen, transplantierbaren Mamma-Adenokarzinom der Fischer Ratte gearbeitet.
Zur Untersuchung der Metastasierung wurde bewußt die Injektion der Tumorzellen in die Fußsohle gewählt. Subkutan-Injektionen führen zwar zu einem großen Primärtumor, die Metastasierung ist jedoch nur sehr schwach. In der Fußsohle metastasiert der Tumor viel eher und der Primärtumor kann durch Amputation des Fußes leicht entfernt werden.
Eine intramuskuläre Injektion der Tumorzellen wurde ebenfalls durchgeführt. Der Tumor wächst dabei wesentlich langsamer und metastasiert nicht so gut wie nach intraplantarer Injektion der Tumorzellen.
Das Tumormodell konnte so aufgebaut werden, daß in Abhängigkeit von der Tumorgröße und der Zeit die Metastasierung durch Amputation des Tumors gesteuert werden kann.
Damit steht ein Modell zur Verfügung, an dem sowohl die Induktion der Sensibilisierung von Lymphozyten durch Tumorzellen studiert werden kann, als auch der Verlauf der Sensibilisierung in Abhängigkeit zur Manifestation des Tumors.
Nicht zuletzt kann der Einfluß von Metastasen untersucht werden, bzw. die Frage geklärt werden, ob und wann die Sensibilisierung nach erfolgreicher Behandlung des Tumors zurückgeht.

D) Antigene

Es konnte gezeigt werden, daß die Reaktion von Tumorratten-Lymphozyten mit HEF dosisabhängig ist, und ebenfalls durch die Lymphozytenkonzentration beeinflußt wird. Diskutiert man den Mechanismus des EMT als Abbau des HEF, so wäre es richtig, daß bei zunehmender Antigenmenge die Hemmung ansteigt, da Lymphozyten von Tumorratten HEF ja nicht so gut abbauen würden wie Lymphozyten von Kontrollen.
Bei der Reaktion in Abhängigkeit zur Lymphozytenkonzentration gibt es jedoch schon einen erheblichen Widerspruch. Lymphozyten von Kontrollen zeigen von $1x10^6$ bis $7x10^6$ keine Veränderung der Reaktivität, obwohl $7x10^6$ Lymphozyten mehr HEF abbauen müßten als $1x10^6$. Die Kinetik der Lymphozyten von Tumorratten verläuft sogar genau umgekehrt als man es erwarten müßte: $1x10^6$ Lymphozyten bauen HEF wesentlich besser ab als $7x10^6$. Nach der Theorie der verminderten Fähigkeit, HEF abzubauen, müßten $1x10^6$ Lymphozyten aber erst recht zu einer hohen Hemmung führen, da weniger Lymphozyten noch weniger HEF abbauen würden.
Unter dem Aspekt, daß es zur Freisetzung eines Faktors kommt, sind beide Kinetiken klar zu interpretieren: mehr Antigen führt zu einer stärkeren EMSF-Produktion und mehr Lymphozyten produzieren mehr EMSF. Somit würde in beiden Fällen eine zunehmende Hemmung der EIZ beobachtet werden, was mit den gefundenen Werten exakt übereinstimmt.
Die Reaktion der Überstände mit unterschiedlichen EIZ-Konzentrationen kann ebenfalls nur durch das Zusammenwirken von Antigen und Faktor erklärt werden. Danach würde die zunehmende Verlangsamung, die Überstände von Kontrollen mit abnehmender EIZ-Konzentration zeigen, erklärt werden durch die Tatsache, daß bei abnehmender EIZ-Konzentration mehr Antigen pro EIZ zur Verfügung steht, und daher die Wanderungs-

geschwindigkeit gehemmt wird. Da Überstände von Tumorratten diese Kinetik nicht zeigen, sondern eine gleichbleibende Verlangsamung mit abnehmender EIZ-Konzentration zu beobachten ist, muß man annehmen, daß die Wirkung des Antigens durch einen im Überschuß vorhandenen Faktor ausgeglichen wird. Würden Lymphozyten von Tumorratten HEF nur geschwächt abbauen, so müßte es auch hier mit abnehmender EIZ-Konzentration zu einem steilen Anstieg der Hemmung kommen, nämlich zu einer Verstärkung der Reaktion, die bei Lymphozytenüberständen von Kontrollen beobachtet wird.

Bei Verwendung des KCl-Extraktes als Antigen im EMT kommt es ebenfalls zu einer dosisabhängigen Reaktion. Allerdings liegt hier im Vergleich zum HEF eine genau umgekehrte Reaktionskinetik vor: die Hemmung der EIZ verstärkt sich mit abnehmender Lymphozytenkonzentration. Das Argument vom Abbau des Antigens kann hier nicht sofort widerlegt werden, es muß zunächst eine Fraktionierung und Reinigung des Antigens vorgenommen werden.

Als Kontrolle zum KCl-Extrakt des Tumors wurde ein KCl-Extrakt aus Nieren gesunder Ratten hergestellt. Lymphozyten von Tumorratten und Kontrollen zeigen keine signifikanten Unterschiede in der Reaktion auf diesen Extrakt. Eine Differenzierung ist also nicht möglich.

Dieselben Resultate liegen beim Einsatz Mitomycin-behandelter Tumorzellen als Antigen vor. Allerdings muß man hier einen anderen Mechanismus vermuten. Während es beim KCl-Extrakt der Niere zu keiner Reaktion kommt, könnte es sich bei der Reaktion von Kontrollen auf die Mitomycin-behandelten Tumorzellen um eine Primärreaktion handeln, da Überstände von Tumorzellen allein keine Wirkung auf die EIZ haben. Es muß also zur Freisetzung eines Faktors gekommen sein.

Da auch in vivo eine Sensibilisierung der Lymphozyten 16 Stunden nach Injektion der Tumorzellen nachge-

wiesen werden kann, ist auch in vitro eine Freisetzung des Faktors 18 Stunden nach Antigenkontakt nicht ausgeschlossen. Eine Differenzierung von Tumorratten und Kontrollen kann also mit Mitomycin-behandelten Tumorzellen nicht erfolgen, da Kontrollen im Gegensatz zum KCl-Extrakt des Tumors bei Mitomycin-behandelten Tumorzellen eine Primärreaktion zeigen, und es damit ebenfalls zur Freisetzung eines Faktors kommt.

Bei einem Vergleich der eingesetzten Antigene zeigt sich, daß sowohl mit HEF, REF, KCl-RAC und EAE-Peptid eine Differenzierung von Tumorratten und Kontrollen vorgenommen werden kann.

HEF und KCl-RAC sind dabei die effektivsten Antigene, d.h., sie führen zu der größten Differenz zwischen der Hemmung, die von Tumorratten bzw. Kontrollen hervorgerufen wird. Interessanterweise scheint bei den untersuchten Antigenen HEF und REF eine immunologische, Spezies-unabhängige Kreuzreaktivität vorzuliegen.

Werner et al. (1978) konnten zeigen, daß Mäuse mit verschiedenen Tumoren gegenüber Mäuse-EF sensibilisiert sind. 1976 hatten Pasternak et al. bereits gezeigt, daß Mäuse mit verschiedenen Tumoren gegenüber Kaninchen-EF sensibilisiert sind, nicht aber gegenüber HEF. Hiermit konnten sie nur eine sehr schwache Reaktion nachweisen. Field et al. (1971) konnten ferner zeigen, daß die antigene Determinante innerhalb des enzephalitogenen Proteins, die mit Lymphozyten von Tumorpatienten reagiert, identisch ist mit der enzephalitogenen Determinante -Ser-Arg-Phe-Ser-Trp-Gly-Ala-Glu-Gly-Gln-Arg-, die die Aminosäurereste 112-122 des enzephalitogenen Proteins darstellt.

In dem hier verwendeten Ratten-Tumormodell konnte nun gezeigt werden, daß Lymphozyten von Tumorratten gegenüber einem synthetischen Acht-Aminosäure-Peptid (human), daß die Aminosäurereste 114-122 umfaßt und die EAE in

Meerschweinchen hervorruft, sensibilisiert sind. Da die Aminosäurezusammensetzung innerhalb der Position 114-122 bei Mensch, Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen und Rind identisch ist (Dunkley u. Carnegie 1974, Westall u. Thompson 1977), könnte dies ein Grund für die Kreuzreaktionen sein.

Ein großer Vorteil immunologischer Reaktionen ist die Sensitivität und insbesondere deren Spezifität. Im Extremfall kann die Änderung einer einzigen Aminosäure immunologisch nachgewiesen werden.

An einen immunologischen Test zur Früherkennung von Krebs sollten also folgende Anforderungen gestellt werden:

1) Differenzierung von malignen und benignen Tumoren
2) Hohe Spezifität (wenig falsch-positive)
3) Hohe Sensitivität (wenig falsch-negative)
4) Organspezifität zur Lokalisation des Tumors

Bei dem Einsatz von HEF oder CaBP im EMT oder MEM ist aber eine organspezifische Tumordiagnose nicht möglich, da alle Tumorarten eine gleichlautende Antwort hervorrufen. 1975 berichteten Müller et al. über eine organspezifische Tumordiagnose mit Hilfe von 3 M KCl-Extrakten aus malignen und gesundem Gewebe. Diese Untersuchungen wurden mit dem MEM durchgeführt, und es gelang z.B. Brustkrebs, Magenkrebs und Darmkrebs spezifisch zu diagnostizieren. Douwes et al. konnten den Einsatz von KCl-Extrakten als Antigen im EMT für eine organspezifische Tumordiagnose bestätigen.

Um den möglichen Einsatz von KCl-Extrakten als spezifisches Antigen experimentell abzusichern, wurde für diese Arbeit ein KCl-Extrakt aus dem R3230AC-Tumor sowie aus Nieren gesunder Ratten hergestellt. Es konnte gezeigt werden, daß eine Differenzierung von Tumorratten und Kontrollen mit Hilfe von KCl-RAC sehr gut möglich ist, wohingegen der KCl-Extrakt der Niere keine Unterscheidung möglich macht. Die Reaktion der Lymphozyten von Tumorratten ist dosisabhängig in be-

zug auf die Antigenmenge und die Lymphozytenkonzentration. Der Einsatz von KCl-Extrakten im EMT konnte damit bestätigt werden, und das Antigen sollte in späteren Untersuchungen näher bestimmt werden.

E) Kinetik der Lymphozytensensibilisierung

Zur Untersuchung der Lymphozytensensibilisierung in Abhängigkeit von der Manifestation des Tumors wurden $1x10^7$ Tumorzellen s.c. injiziert und die Ratten täglich im EMT untersucht. Unbehandelte Ratten, die über mehrere Tage gemessen werden, zeigen keine signifikanten Schwankungen, sodaß Werte von 2-6% als Kontrollbereich angesehen werden können.
Tumorratten zeigen bereits nach 24 Stunden eine positive Reaktion im EMT. An Tag 2 und 5 kommt es zu einem vorübergehenden Abfall der Reaktivität, die dann aber bis zum Tod der Tiere nach ca. 3 Wochen in konstanter Höhe nachweisbar ist und eine Verlangsamung der EIZ von 18-22% hervorruft.
Kontrollen, die mit NaCl, PBS, sowie syngenen und allogenen Lymphozyten durchgeführt werden, ergeben keine Reaktionskinetik, die gemessenen Werte liegen alle im Bereich der unbehandelten Ratten.
Somit kann man die gemessene Kinetik bei Tumorratten als spezifisch für die Reaktion der Lymphozyten gegenüber dem Tumor ansehen.
Schwankungen aus technischen Gründen können ebenfalls ausgeschlossen werden.
Die Sensibilisierung kann bereits sehr früh, nach 24 Stunden nachgewiesen werden. In einer weiteren Kinetik zur Erfassung der frühen Sensibilisierung konnte gezeigt werden, daß eine deutlich signifikante Reaktion gegenüber Kontrollen zum ersten Mal nach 16 Stunden gemessen werden kann.
Unter Verwendung des MMI konnten Flavell et al. (1978) zeigen, daß Lymphozyten von Hamstern, die einen SV-40-induzierten Tumor tragen, 21 Tage nach Injektion der

Tumorzellen zum ersten Mal positiv reagieren. Mit demselben Tumormodell konnten Shelton et al. (1975) nach 10 Tagen zum ersten Mal eine positive Reaktion im MMI beobachten. Man könnte daraus schließen, daß der EMT wesentlich besser geeignet ist, frühe Sensibilisierungsstadien in Tumor-tragenden Tieren zu erfassen.
Um diese Frage klar beantworten zu können, müßten direkte Vergleiche von EMT und MMI durchgeführt werden. Die Ergebnisse von Shelton und Flavell sind mit den hier aufgeführten nicht direkt vergleichbar, da unterschiedliche Tumormodelle benutzt wurden.

Der relativ starke Abfall an Tag 2 und 5 konnte experimentell abgesichert werden und ist beliebig reproduzierbar. Eine Erklärung für diese Erscheinung ist jedoch sehr schwierig. Wie bereits erwähnt, ist es mit dem EMT möglich, bereits sehr frühe Reaktionen von Lymphozyten zu erfassen, so daß wir es hier mit Reaktionen zu tun haben könnten, die auf Grund der bisher üblichen Testsysteme einfach nicht erkannt werden konnten. Da sich die Reaktionskinetik mit abnehmender Tumorzellkonzentration ändert, und bei einer Injektion von 10^2 Tumorzellen eine positive Reaktion im EMT während der ersten zwei Wochen überhaupt nicht beobachtet werden kann, darf man annehmen, daß dieser Abfall der Reaktivität etwas mit dem Angehen, vielleicht sogar mit dem "sneaking through" des Tumors zu tun hat. Vielleicht verläuft die Sensibilisierung der Lymphozyten aber auch nicht kontinuierlich ab, so daß verschiedene Stadien durch eine latente Phase abgelöst werden.
Interessant ist die Kinetik der Lymphozytenüberstände ohne Antigenzusatz. Während Lymphozyten unbehandelter Ratten ohne Antigenzusatz zu einer Beschleunigung der EIZ von 2-6% führen, kommt es bei Lymphozytenüberständen von Tumorratten auch ohne Antigenzusatz nach 12 Tagen zu einer Verlangsamung der EIZ. Die Differenz

zu Kontrollen liegt dabei zwischen 4und 6%. Dies kann so gedeutet werden, daß die Lymphozyten von Tumorratten bereits in vivo sensibilisiert sind und dann in vitro auch ohne Antigenkontakt mit der Produktion von EMSF, wenn auch nur in schwachem Maße, fortfahren. Diese Untersuchungen stimmen überein mit anderen Arbeiten (Papageorgious et al. 1972, Tubergen et al. 1972), in denen gezeigt werden konnte, daß auch andere Lymphokine, z.B. MIF, von Lymphozyten, die bereits in vivo sensibilisiert worden sind, in vitro auch ohne Antigenkontakt weiterproduziert werden. Yoshida konnte bei Patienten mit Sezary-Syndrom ebenfalls nachweisen, daß deren Lymphozyten in vitro mit der Produktion von MIF fortfahren, wenn man sie länger als 24 Stunden inkubiert.
Man kann also auch im Fall des EMSF davon ausgehen, daß in vivo bereits vorsensibilisierte Lymphozyten in vitro mit der Abgabe des Faktors fortfahren.

Die nun folgenden Verlaufsstudien wurden mit abnehmender Tumorzellkonzentration durchgeführt. Außerdem wurde neben HEF auch das KCl-RAC Antigen eingesetzt. Überraschenderweise löst der KCl-RAC Extrakt dieselbe Reaktion in Lymphozyten von Tumorratten aus wie HEF. Die Kinetik der Lymphozytensensibilisierung verläuft exakt identisch mit der, die HEF als Antigen hervorruft.
Hierfür können zwei Erklärungen angeführt werden: Obwohl bis heute nicht nachgewiesen, könnte eine Kreuzreaktivität zwischen HEF und KCl-RAC bestehen. Erst kürzlich berichtete eine Gruppe aus der DDR (Jenssen et al. 1977) über die Auftrennung von KCl-Extrakten in ein allgemeines, nicht-organspezifisches Suchantigen und ein spezifisches Tumorantigen, das zur organspezifischen Tumordiagnose verwendet werden kann. Man könnte also postulieren, daß HEF mit dem allgemeinen Tumorantigen aus KCl-Extrakten kreuzreagiert.
Dagegen spricht, daß in den hier aufgeführten Unter-

suchungen der KCl-Extrakt nur eine Fraktion enthält, die im EMT aktiv ist. Die Möglichkeit, daß das allgemeine und das spezifische Tumorantigen sich dabei im Molekulargewicht überschneiden, kann nicht ausgeschlossen werden.
Caspary und Field (1971) konnten zeigen, daß alle Tumoren ein dem HEF verwandtes Antigen besitzen, das CaBP, und Coates et al. (1974) konnten eine eindeutige Kreuzreaktivität zwischen HEF und CaBP nachweisen. Die zweite Erklärung wäre also, daß ein und dieselbe Tumorzelle mehrere Antigene besitzt, u.a. CaBP und spezifische Antigene, die durch KCl-Extraktion gewonnen werden können, und daß diese Antigene in vitro eine gleichlautende Reaktion in Lymphozyten hervorrufen.
Wird die injizierte Tumorzelldosis weiter gesenkt, so kommt es bei 10^3 Tumorzellen zu einer Änderung der Kinetik. Eine Sensibilisierung ist zwar ebenfalls nach 24 Stunden nachweisbar, ein erster starker Rückgang der Sensibilisierung wird jedoch erst am Tag 9 beobachtet. Damit einher geht auch das wesentlich spätere Angehen des Tumors, ein deutliches Tumorwachstum wird erst nach 10-14 Tagen im Odi-Test gemessen. Bei einer Konzentration von 10^3 Tumorzellen gehen aber alle Tumoren an, es kommt zu keiner Abstoßungsreaktion.
Bei der Injektion von $1x10^2$ Tumorzellen bleibt die Reaktion in den ersten zwei Wochen negativ. Das bedeutet, daß 10^2 Tumorzellen als Inokulum nicht ausreichen, um eine Sensibilisierung nach 24 Stunden manifest werden zu lassen. Erst nach drei Wochen werden die ersten Tiere im EMT positiv und zeigen dann auch erste Anzeichen von Tumorwachstum. Insgesamt gehen 50% der Tumoren an, die anderen werden abgestoßen. Ratten, die keinen Tumor bekommen, zeigen keine positive Reaktionen im EMT.
Damit steht fest, daß in unserem System die kritische

Tumorzelldosis zur Erzeugung einer positiven Reaktion der Lymphozyten nach 24 Stunden zwischen 10^2 und $5x10^2$ Tumorzellen liegt, da gezeigt werden konnte, daß auch $5x10^2$ Tumorzellen bereits nach 24 Stunden zu einer positiven Reaktion der Lymphozyten im EMT führen.
Andererseits muß hier natürlich kritisch angemerkt werden, daß ein transplantierter Tumor nicht mit einem induzierten gleichzusetzen ist. Es wäre also interessant, bei einem chemisch- oder Virus-induzierten Tumor ähnliche Untersuchungen zu machen, um dann bei einem positiven Ergebnis im EMT durch histologische Untersuchungen zu klären, wie weit der Tumor angewachsen ist und in welchem Stadium er sich befindet.

F) Einfluß der Metastasierung auf den EMT

Die Frage der Metastasierung ist bei der Tumordiagnose, insbesondere nach operativen Eingriffen, von besonderem Interesse.
In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß nach Amputation des Primärtumors zunächst eine einwöchige operationsbedingte Suppression in der EMSF-Aktivität der Lymphozyten auftritt.
Tiere mit Metastasen zeigen dann aber eine Sensibilisierung bis zum Tod nach etwa sechs bis sieben Wochen.
Bei Tieren, die keine Metastasen bekommen, kann eine Sensibilisierung bis zu vier Wochen nach der Amputation nachgewiesen werden, dann aber gehen die gemessenen Werte auf Kontrollwerte zurück, und eine Sensibilisierung läßt sich nicht mehr nachweisen.
Diese Daten erscheinen in bezug auf das Humansystem sehr wichtig. Für einen gewissen Zeitraum nach der Operation kann es zu falsch-negativen Resultaten kommen. Auf der anderen Seite konnte hier zum ersten Mal gezeigt werden, daß in einem klar definierten

Tumormodell die Sensibilisierung nach erfolgreicher Therapie, in diesem Fall nach vollständiger Ausräumung des Tumorherds, und falls keine Metastasen gebildet worden sind, vollständig zurückgeht.

Vergleichbare Studien beim Menschen liegen nicht vor, da solche definierten Studien im Humansystem nicht durchgeführt werden können. Weiterhin erscheint es als sehr wichtig, daß die gefundenen Werte mit KCl-RAC als Antigen den mit HEF gemessenen entsprechen. Gerade in der postoperativen Phase ist es sehr wichtig, falsch-positive Ergebnisse, die durch HEF hervorgerufen werden können, auszuschließen. Durch den Einsatz spezifischer Antigene in Form der KCl-Extrakte ist dies möglich, und man könnte so spezifisch Metastasen nachweisen, ohne befürchten zu müssen, durch andere Erkrankungen, wie z.B. Influenza, falsch-positive Ergebnisse zu bekommen.

G) Untersuchungen zum Mechanismus des EMT

Die zweimalige Stimulation von Lymphozyten mit HEF zeigt, daß Lymphozyten von Tumorratten nicht zweimal hintereinander mit der Ausschüttung des Faktors reagieren können.
Andererseits geben diese Untersuchungen wieder einen Hinweis auf den Mechansimus des EMT. Sollte es sich um einen Abbau des HEF handeln, so würden Lymphozyten von Tumoratten das HEF wie bereits erwähnt weniger stark abbauen als Lymphozyten von Kontrollen. Dies wäre aber im Hinblick darauf, daß Lymphozyten von Tumorratten beim zweiten HEF-Kontakt dieses bis auf 4% Hemmung abbauen, völlig unverständlich. Dies ist ein Wert, der dem von Kontrollen exakt entspricht und bedeutet, daß Lymphozyten von Tumorratten den HEF-Extrakt genauso gut abbauen können wie Kontrollen. Beim ersten Antigenkontakt reagieren sie jedoch zusätzlich mit der Ausschüttung von EMSF.

Geht man davon aus, daß im EMT ein Lymphokin nachgewiesen wird, so ergeben sich interessante Parallelen zu Arbeiten von Halliday et al.(1975) über den LAI-Test. Er konnte die Bildung eines Lymphokins nachweisen, dessen Ausschüttung nach Antigenkontakt von sensibilisierten Lymphozyten nach 60 Minuten ein Maximum hatte. Es wurde daraufhin postuliert, daß es sich um einen vorgeformten Faktor handelt, der kurz nach Antigenkontakt freigesetzt wird und dann innerhalb der nächsten Stunden nicht nachgebildet wird. Diese Angaben stellen in der Tat eine Parallele zum hier untersuchten EMSF dar. Auch beim EMSF kommt es bereits wenige Minuten nach Antigenkontakt zur Freisetzung des Faktors, der dann auf erneuten Antigenkontakt hin nicht wieder innerhalb der nächsten 18 Stunden abgeben werden kann.
Andererseits ergeben sich natürlich hierdurch Differenzen zum MIF, als dessen Korrelat der MSF bzw. EMSF sehr oft angesehen wird. MIF-Produktion kann erst vier bis sechs Stunden nach Antigenkontakt nachgewiesen werden, außerdem fahren die Zellen unter Anwesenheit des Antigens bis zu vier Tage mit der Produktion von MIF fort (Rocklin 1976). Der von Halliday beschriebene Faktor im LAI-Test hatte ebenfalls MIF-Eigenschaften, so daß als Unterschied zum MIF sowohl beim LAI-Faktor als auch beim MFS/EMSF die frühe Ausschüttung des Faktors sowie die Nicht-Weiterproduktion stehen.
Es muß allerdings erwähnt werden, daß andere Gruppen (Holan et al. 1974) nicht in der Lage waren, beim LAI-Test einen Faktor nachzuweisen.
Die einmalige Abgabe des EMSF nach Antigenkontakt steht außerdem im Widerspruch zu der Annahme, daß EMSF bereits durch in vivo Sensibilisierung ausgeschüttet wird, und diese Ausschüttung in vitro auch ohne Antigen sehr schwach weiterläuft. Es ist natürlich vorstellbar, daß in vitro durch Antigenkon-

takt eine sehr plötzliche und totale Ausschüttung des EMSF einsetzt, da es sich ja hierbei um eine Zweiterkennung handelt.
Die Tatsache, daß EMSF mit EIZ absorbiert werden kann, andererseits aber auch von den EIZ wieder heruntergewaschen werden kann, spricht zumindestens teilweise für einen passiven Prozeß der EMSF-EIZ-Interaktion. Hier könnte ein Unterschied im Mechanismus zwischen EMT und MEM liegen, denn die Reaktion von MSF mit den Makrophagen kann durch Puromycin gehemmt werden, d.h Makrophagen sind aktiv an der Interaktion mit MSF beteiligt (Caspary 1972), da eine Proteinsynthese nötig ist, um die Verlangsamung manifest werden zu lassen. Eine Interaktion dieser Art kann bei Verwendung von tannierten und Sulfosalicylsäurestabilisierten Erythrozyten natürlich ausgeschlossen werden.
1975 konnten Porzsolt et al. zeigen, daß die Bildung eines "slowing"-Faktors bei Humanlymphozyten und EF als Antigen durch Vorbehandlung der Lymphozyten mit Puromycin gehemmt werden kann. Es wurden daher in dieser Arbeit ebenfalls Hemmversuche durchgeführt. Bei der Verwendung von Mitomycin (DNS-Blockade) konnte keine Hemmung erzielt werden. Durch Hemmung der Proteinsynthese mit Puromycin kann jedoch die EMSF-Produktion total gehemmt werden. Diese Ergebnisse zeigen, daß für die Freisetzung von EMSF keine DNS-abhängige Synthese notwendig ist.
Die Hemmung der EMSF-Freisetzung mit Puromycin stützt die Hypothese eines vorgefertigten Faktors, da die Zugabe von Puromycin 30 Minuten nach Antigenkontakt die Ausschüttung von EMSF nicht mehr blockiert, der Faktor ist bereits ins umgebende Medium abgegeben worden. Außerdem spricht die Hemmung mit Puromycin für einen aktiven Transport des Faktors durch die Zellmembran.
Die Kinetik der EMSF-Freisetzung zeigt, daß bereits wenige Minuten nach Antigenkontakt EMSF im Überstand

nachgewiesen werden kann. Dies deutet auf eine sehr schnelle Freisetzung, für die es in der Literatur so gut wie keine Referenzen gibt.
Gerade das Zytopherometer ermöglicht es jedoch, Membranveränderungen sehr schnell zu messen. Dies konnte 1978 von Blume et al. bestätigt werden. Sie setzten die elektrophoretische Beweglichkeit von Lymphozyten als Maß für eine Interaktion der Lymphozyten mit Con A ein und konnten zeigen, daß bereits fünf Minuten nach Stimulation der Lymphozyten mit Con A deren elektrophoretische Beweglichkeit signifikant erhöht ist. Zusätzlich konnten sie einen Faktor nachweisen, der die Oberflächenladung von Lymphozyten, die kein Con A binden, verändert.

Um etwas über den Verbleib des Antigens zu erfahren, wurden Stimulierungsversuche mit Lymphozytenüberständen von Tumorratten und Kontrollen durchgeführt. Diese Versuche zeigen deutlich, daß das Antigen sowohl in Lymphozytenüberständen von Tumorratten als auch von Kontrollen noch enthalten ist und somit von den Lymphozyten nicht abgebaut oder absorbiert wird. Bei diesen Versuchen wird zum ersten Mal beobachtet, daß die von Lymphozytenüberständen hervorgerufene Hemmung der EIZ größer ist als die Hemmung des eingesetzten Antigens allein. Werden Lymphozytenüberstände von Kontrollen nach Inkubation mit HEF (Hemmung 4-6%) erneut mit Lymphozyten von Tumorratten inkubiert, so wird jetzt eine Hemmung von 20-24% gemessen. Hier kann also kein Antigen mehr abgebaut worden sein, sondern hier muß es zur Bildung eines Faktors gekommen sein, der die EIZ zusätzlich verlangsamt.

H) Reiniung der Antigene

Es mußten zunächst die Extrakte (HEF und KCl-RAC) fraktioniert und die Antigene isoliert werden, bevor eine Chrakterisierung von EMSF vorgenommen werden konnte.
Aus beiden Extrakten konnte mit Hilfe von Amicon Mem-

bran-Filtration, Ionenaustauscherchromatographie und Molekularsiebchromatographie das entscheidende Antigen isoliert werden.
Im Fall des HEF-Extraktes handelt es sich um ein Protein mit einem Molekulargewicht von 16.-20.000d. Damit könnte es sich um das von Field und Caspary (1970) beschriebene enzephalitogene Protein handeln. Das Antigen, das aus dem KCl-Extrakt des Primärtumors isoliert werden konnte, hat ein Molekulargewicht von 14.-16.000d und ist damit etwas kleiner als das aus dem HEF-Extrakt.
Beide Proteine selbst sind nicht mehr in der Lage, in den untersuchten Konzentrationen die EIZ zu beeinflussen, nach Inkubation mit Lymphozyten von Tumorratten führen sie jedoch zu einer Hemmung von 16-20%. Diese Hemmung kann nicht mehr auf die Eigenreaktivität des Antigens zurückgeführt werden, sondern nur noch durch die Bildung von EMSF erklärt werden.

I) Charakterisierung von EMSF

Mit Hilfe des gereinigten Antigens aus dem HEF-Extrakt sollten nun Untersuchungen zur Natur des EMSF durchgeführt werden. Es konnte ein Faktor mit folgenden Merkmalen isoliert werden: EMSF-Aktivität, MG = größer 80.000d, hitzestabil bei 56°C für 30 Minuten, Trypsin-sensibel, stabil unter 6 M Harnstoff.
Da zusätzlich das Antigen aus den ankonzentrierten Überständen, die zur Untersuchung von EMSF dienten, zurückgewonnen werden konnte, und erneut Lymphozyten von Tumorratten stimulieren konnte, ist damit ebenfalls der Nachweis von EMSF erbracht.
Die bisher bei der Untersuchung des EMT bzw. MEM beschriebenen Faktoren (Pritchard et al. 1973, Preece u. Light 1974, Jenssen et al. 1976) können mit dem hier beschriebenen nicht verglichen werden, da jeweils andere Systeme (Mensch, Maus) zugrunde lagen.

Untersuchungen über Lymphokine bei der

Ratte gibt es nur sehr wenige. Die Arbeitsgruppe von Bakker et al. (1975) beschrieben einen Faktor in PPD-erzeugten Überständen von Rattenlymphozyten. Das Molekulargewicht des Faktors wurde mit 20.-70.000d angegeben und ist damit sehr ungenau bestimmt. Sie konnten jedoch nachweisen, daß dieser Faktor in vitro MIF-Aktivität besitzt.

K) Concanavalin A-induzierter EMSF

Die Produktion von Lymphokinen, insbesondere MIF, kann aber nicht nur durch den Antigenreiz bereits sensibilisierter Lymphozyten erfolgen, sondern auch durch Stimulation von Lymphozyten mit Lektinen, wobei Con A eine zentrale Stellung einnimmt (Remold et al. 72). Der Einsatz solcher Lektine hat den Vorteil, daß eine vorherige Sensibilisierung nicht stattzufinden braucht, und das Lymphokin in größeren Mengen produziert wird.
Die Verwendung von Con A zur Induktion von Lymphokinen hat jedoch den Nachteil, daß die im Überstand verbleibenden Reste des ConA auf Indikator-Makrophagen inhibierend wirken (Taylor et al. 1975). Da nur sehr selten reine Makrophagen verwendet werden, stattdessen jedoch meistens Peritoneal-Exudatzellen mit einem gewissen Anteil an Lymphozyten, übt Con A zusätzlich einen stimulierenden Effekt auf die Lymphozyten aus. Damit kommt es wiederum zu einer Freisetzung von Lymphokinen, die dann zu einer Verfälschung des Meßergebnisses führen. Daher muß Con A eliminiert werden bzw. neutralisiert werden. Dies bringt jedoch verschiedene Nachteile mit sich, so z.B. Verfälschungen der Meßergebnisse durch unvollständige Beseitigung des Con A oder Verdünnungen von Überständen, die nachher wieder ankonzentriert werden müssen.

Im Zusammenhang mit dem EMT oder MEM gibt es bis heute nur eine Arbeitsgruppe (Preece u. Light, 1974), die einen Con A-induzierten "slowing"-Faktor

beschrieben hat.
Es sollte daher in dem hier beschriebenen Modell versucht werden, EMSF durch Con A-Stimulation von Lymphozyten zu produzieren. Dabei gibt es bei der hier beschriebenen Methode eine Reihe von Vorteilen: Die Möglichkeit einer unspezifischen Beeinflussung der EIZ kann exakt kontrolliert werden, indem Verdünnungsreihen des Con A direkt mit EIZ inkubiert werden, oder aber stets ein O-Wert mit Con A-Zusatz mitgeführt wird. Da keine Lymphozyten mit den zu testenden Überständen in Verbindung kommen, kann eine unspezifische erneute Stimulation durch Reste des Con A ausgeschlossen werden. Da es sich bei den EIZ nicht um lebende Zellen handelt, kann es sich zudem bei der Beeinflussung durch Con A lediglich um einen passiven Effekt handeln.
Genaue Untersuchungen zeigten jedoch, daß Con A keinen Einfluß auf die EIZ hat.
Tatsächlich konnte dann in dieser Arbeit gezeigt werden, daß Con A-induzierte Überstände von Lymphozyten (Tumorratten und Kontrollen) eine Hemmung der EIZ bis zu 16% erzielen.
Die Isolation des Faktors ergab ein dem HEF-induzierten EMSF in allen Punkten identisches Protein: MG größer 80.000d, hitzestabil bei 56°C für 30 Minuten, Trysin-sensibel und stabil unter 6 M Harnstoff.
Aus diesen Untersuchungen kann die Vermutung geäußert werden, daß es sich bei dem HEF- bzw. Con A-induzierten EMSF um identische Faktoren handelt.
Die Tatsache, daß auch mit Con A ein EMSF-ähnlicher Faktor isoliert werden kann, unterstützt besonders die hier vertretene Ansicht, daß der EMT zur Erfassung von Tumorerkrankungen auf dem Nachweis eines Lymphokins beruht.

Zusammenfassung

Es konnte zunächst gezeigt werden, daß Lymphozyten von Fischer 344 Ratten mit einem spontanen transplantierbaren Mammaadenokarzinom nach Inkubation mit einem basischen Myelinprotein von Ratte und Mensch, sowie einem 3 M KCl-Extrakt des Tumors einen Faktor (EMSF, Electrophoretic Mobility Slowing Factor) freisetzen, der die elektrophoretische Beweglichkeit von tannierten und Sulfosalicylsäure stabilisierten Schafserythrozyten (EIZ) herabsetzt. Ausgehend von diesen Untersuchungen sollten im wesentlichen folgende Fragen untersucht werden:

1) Gibt es eine Kinetik der Lymphozytensensibilisierung?
2) Wann läßt sich die Sensibilisierung zum ersten Mal messen?
3) Wieviele Tumorzellen sind zur Induktion einer Sensibilisierung notwendig?
4) Wie verläuft die Sensibilisierung nach Amputation des Primärtumors, und welchen Einfluß haben Metastasen?
5) Wie verläuft die Sensibilisierung mit HEF (humaner enzephalitogener Faktor) bzw. KCl-RAC (3 M KCl-Extrakt des Tumors) als Antigen im EMT?
6) Ist es möglich EMSF zu isolieren und zu charakterisieren?
7) Läßt sich EMSF durch Concanavalin A induzieren?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurde das Tumormodell optimiert. $6x10^5$ Tumorzellen werden intraplantar injiziert. In Abhängigkeit von der Zeit und der Größe des Primärtumors läßt sich die Metastasierung durch Amputation des Primärtumors beeinflussen.

Bereits 16 Stunden nach Implantation des Tumors kann eine Sensibilisierung der Lymphozyten im EMT nachgewiesen werden. Diese zeigt an Tag 2 und 5 einen deutlichen Abfall, bleibt aber dann bis zum jeweiligen Amputationszeitpunkt erhalten.

In Tieren mit Metastasen läßt sich EMSF-Aktivität bis zum Tod der Tiere nachweisen, während in der Gruppe ohne Metastasen die Sensibilisierung innerhalb von 4 bis 6 Wochen zurückgeht.
Die Kinetiken mit HEF bzw. KCl-RAC sind identisch.
Es konnte gezeigt werden, daß $2{,}5 \times 10^2$ Tumorzellen die minimale Dosis sind, um nach 24 Stunden eine Sensibilisierung der Lymphozyten herbeizuführen.
Zur Untersuchung des Mechanismus wurde der HEF-Extrakt durch Ultramembran-Filtration, Säulenchromatographie und SDS-Polyacrylamid-Diskelektrophorese fraktioniert und das Antigen gereinigt. Es hat ein Molekulargewicht von 16.-20.000d.
Mit diesem gereinigten Antigen wurden Untersuchungen zur Natur des EMSF durchgeführt. Das Molekulargewicht von EMSF wurde auf größer 80.000d bestimmt. Durch 6 M Harnstoffanalyse ergab sich kein Hinweis auf das Vorliegen eines Aggregates. EMSF ist hitzestabil aber Trypsin-sensibel.
Ein EMSF-ähnlicher Faktor konnte aus ConA-induzierten Überständen von Lymphozyten tumortragender Ratten sowie Kontrollen gewonnen werden. Das Molekulargewicht liegt ebenfalls bei über 80.000d, der Faktor ist hitzestabil und Trypsin-sensibel. Es kann daher die Vermutung geäußert werden, daß der HEF- und ConA-induzierte EMSF identische Faktoren sind.
Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß mit Hilfe des EMT eine Differenzierung von Tumorratten gegenüber Kontrollen möglich ist. Ferner konnte zum ersten Mal gezeigt werden, daß die Sensibilisierung (in Ratten) nach erfolgreicher Amputation des Tumors zurückgeht.
Die Frage nach dem Mechanismus des EMT konnte für das verwendete Tumormodell durch den Nachweis von EMSF und dessen Abgrenzung vom eingesetzten Antigen eindeutig beantwortet werden.

Literaturverzeichnis

Alexander, P. (1972) Foetal "antigens" in cancer. Nature 235, 137

Alexander, P. (1974) Escape from immune destruction of the host through shedding of surface antigens. Is this a characteristic shared by malignant and embryonic cells? Cancer Research 34, 2077

Alvord, E.C. (1968) In: The Central Nervous System p. 52, Ed. by Bailey, O.T.R., Smith, D.E., Baltimore, Williams and Wilkens Co.

Ambrose, E.J., James, A.M., Lowick, J.H.B. (1956) Differences between the electrical charge carried by normal and homologous tumor cells. Nature, 177, 576

Ambrose, E.J. (1965) Cell Electrophoresis, edited by E.J.Ambrose, J.u.A. Churchill Ltd., London

Arvilommi, H., Dale, M.M., Desai, H.N., Mongar, J.L., Richardson, M. (1977) Failure to obtain positive MEM tests in either cell-mediated immune conditions in the guinea-pig or in human cancer. Br.J.Cancer 36, 545

Astor, S.H., Spikler, L.E., Frick, O.L., Fudenberg, H.H. (1973) Human Leucocyte Migration Inhibition in agarose using four antigens: correlation with skin reactivity. J.Imm., 110, 1174

Bagshawe, K.D. (1977) Workshop on Macrophage Electrophoretic Mobility and Structuredness of Cytoplasmic Matrix Tests. Br.J.Cancer 35, 701

Bakker, W.W., van den Berg, W., Hoedemaeker, PH.J. (1975) Lymphokines in sensitized rats (II). Z. Immun.-Forsch., 150, 31

Bangham, A.D., Heard, D.H., Flemans, R., Seaman G.V.F. (1958) An apparatus for microelectrophoresis of small particles. Nature, 182, 642

Bauer, H. (1974) Virion and tumor cell antigens of C-type RNA-tumor viruses. Adv. Cancer Res. 20, 275

Bendixen, G., Soborg, M. (1967) Human lymphocyte migration as a parameter of hypersensitivity. Acta Med.Scand. 181, 247

Bendixen, G. (1967) Specific inhibition of the in vitro migration of leucocytes in ulcerative colitis and Crohn's disease. Scand.J.Gastroent. 2, 214

Bennett, B., Bloom, B.R. (1968) Reactions in vivo and in vitro produced by a soluble substance associated with delayed type hypersensitivity. Proc.Natl.Acad.Sci., USA, 59, 756

Bert, G., di Cassono, D.L., Pecco, P. (1969) The detection by cellular electrophoresis of surface antigens in human lymphocytes. Clin.exp.Imm. 5, 669

Bloom, B.R., Bennett, B. (1966) Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed type hypersensitivity. Science 153, 80

Bloom, B.R., Bennett, B., Oettgen, H.F., Mc Lean, E.P., Old, L.J. (1969) Demonstration of delayed hypersensitivity to soluble antigens of chemically induced tumors by inhibition of macrophage migration. Proc.Natl.Acad.Sci., USA, 64, 1176

Blume, P., Malley, A., Knox, R.J., Seaman, G.V.F. (1978) Electrophoretic mobility as a sensitive probe of lectin-lymphocyte interaction. Nature 271, 378

Boddie, A.W.J., Holmes, E.C., Roth, J.A., Morton, P.L. (1975) Inhibition of human leucocyte migration in agarose by KCl-extracts of carcinoma of the lung. Int.J.Cancer 15, 823

Carnegie, P.R. (1969a), Biochem. J. 111, 240

Carnegie, P.R. (1969b), Nature 223, 958

Carnegie, P.R. (1971) Amino acid sequence of the encephalitogenic basic protein from human myelin. Biochem. J. 123, 57

Carnegie, P.R. (1971) Properties, structure, and possible neuroreceptor role of the encephalitogenic protein of human brain. Nature 229, 25

Carnegie, P.R., Caspary, E.A., Field, E.J. (1971) Identification of a tumor antigen. Proc.Biochem. Soc., 12 November 1971

Carnegie, P.R., Caspary, E.A., Dickinson, J.P., Field, E.J. (1973) The Macrophage Electrophoretic Migration Test for lymphocyte sensitization. Clin.exp.Immunol., 14, 37

Caspary, E.A., Hughes, D., Field, E.J. (1970) On the mode of action of ALS. Clin.exp.Imm. 7,395

Caspary, E.A., Field, E.J. (1971) Specific lymphocyte sensitization in cancer: Is there a common antigen in human malignant neoplasia? Br.Med.J., II, 1613

Caspary, E.J. (1971) Lymphocyte-antigen interaction in Electrophoretic Mobility Test for cellular sensitization. Nature New Biol. 231, 24

Caspary, E.A. (1972) The mechanism of antigen-induced electrophoretic mobility reduction of guinea-pig macrophages. Clin.exp.Imm. 11, 305

Churchill, W.H., Rocklin, R.E. (1973) Studies on the detection of cellular immunity to human tumors by the inhibition of macrophage migration. Natl.Canc.Inst. Monogr. 37, 135

Clausen,J.E. (1971) Tuberculin-induced migration inhibition of human peripheral leucocytes in agarose medium. Acta Allerg. 26, 56

Coates, A.S., Carnegie, P.R. (1975) Immunological cross-reactivity between basic proteins of myelin and cancer. Clin.exp.Imm. 22, 16

Cochran A.J., Grant, R.M., Spilg, W.G., Russell, J.M. (1974) Sensitization to tumor associated antigens in human breast carcinoma. Int.J.Cancer 14,19

Cohen, S., Ward, P.A., Yoshida, T., Burck, C.L. (1973) Biological activity of extracts of delayed hypersensitivity skin reaction sites. Cell.Imm. 9, 363

Davey, F.R., Moloney, W.C. (1970) Postmortem observations on Fischer Rats with leukemia and other disorders. Laboratory Investigation 23(3), 327

David, J.R., Al-Askari, S., Lawrence, H.S., Thomas, L. (1964) Delayed hypersensitivity in vitro. The specificity inhibition of cell migration by antigens. J.Imm. 93, 264

David, J.R. (1966) Delayed hypersensitivity in vitro. Its mediation by cell free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. Proc.Natl.Acad. Sci. USA, 56,72

Dermott, J.R., Caspary, E.A., Dickinson, J.P. (1974) Antigen cross-reactivity in the Macrophage Electrophoretic Mobility Test. Clin.exp.Imm. 17,103

Dickinson,J.P., Caspary, E.A., Field, E.J. (1972) Localisation of tumor specific antigen on external surface of plasma membrane. Nature New Biol. 239, 181

Dickinson, J.P., Caspary E.A., Field, E.J. (1973) A common tumor specific antigen. Br.J.Cancer 27, 99

Diengdoh, J.V., Turk, J.L. (1968) Electrophoretic mobility of guinea-pig peritoneal exudate cells in hypersensitivity reactions. Int.Arch.Allergy 34,297

Douwes F.R., Hüttemann, U., Mross, K. (1977) Immundiagnostik maligner Erkrankungen. DMW 102, 419

Douwes, F.R., Hanke, R., Mross, K. (1976) Der Elektrophorese-Mobilitäts-Test in der Diagnostik von Malignomen. Z.Krebsforsch., 87, 281

Douwes, F.R., Spellmann, H.J., Mross, K., Wolfrum, D.I. (1978) Immundiagnostics of malignant disease. Oncology, 35, 163

Dunkley, P.R., Carnegie, P.R. (1974) Amino acid sequence of the smaller basic protein from rat brain myelin. Biochem.J., 141, 243

Dyson, J.E.D., Corbett, P.J. (1978) Effect of lymphocyte supernatants on the electrophoretic mobility of

Eng, L.F., Chao, F.C., Pratt, D. (1968) The maturation of human white matter myelin: Fractionation of the myelin membrane proteins. Biochemistry, 7, 4455

Engish, D., Andersen, B.R. (1974) Single step separation of red blood cells, granulocytes and mononuclear leucocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque. J.Imm.Meth. 5, 249

Eylar, E.H., Thompson, M. (1969) Allergic encephalomyelitis: the physico-chemical properties of the basic protein encephalitogen frem bovine spinal cord. Arch. Biochem. Biophys., 129, 468

Field, E.J., Caspary, E.A. (1970) Lymphocyte sensitization: An in vitro test for cancer? Lancet II, 1337

Field, E.J., Caspary, E.A., Carnegie, P.R. (1971) Lymphocyte sensitization to basic protein of brain in malignant neoplasia: Experiments with serotonin and related compounds. Nature, 233, 284

Field, E.J. (1973) Macrophage Electrophoretic Migration Test in Cancer. In: Imm. Techniques for the detection of cancer. Ed. Bertil Björklund, Bonniers, Stockholm

Fish, R.G. (1977) Cancer detection with human peripheral lymphocytes: A word of caution. Med. Hypothesis 1(4)

Flavell, D.J., Goepel, J., Potter, C.W., Carr, I. (1978) Cellular immunity to encephalitogenic factor as measured by macrophage migration inhibition during tumor induction and growth. Br.J.Cancer 37, 818

Foley, E.J. (1953) Antigenic properties of methyl-cholanthrene induced tumors in mice of the strain of origin. Cancer Research 13, 835

Forrester, J.A., Dando, P.M., Smith, J.W., Turberville, C. (1977) Failure to confirm the macrophage electrophoretic mobility test in cancer. Br.J.Cancer 36, 537

Fuhrmann, G.F., Ruhenstroth-Bauer, G.(1965) Cell electrophoresis employing a rectangular measuring cuvette. In: Cell Electrophoresis, Ed. E.J.Ambrose, J.u.A.Curchill Ltd., London

Geczy, C.L., Friedrich, W., de Weck, A.L. (1975) Production of antibodies against guinea pig lymphokines. Cell.Imm. 19, 65

George, M., Vaughan, H.J. (1972) In vitro cell migration as a model for delayed type hypersensitivity. Proc.Soc.exp.Biol. and Med. 111, 514

Glaves, D., Harlos, J.P., Weiss, L. (1977) The Macrophage Electrophoretic Mobility Test: Results On Carcinoma of the Colon and Rectum. Int.J.Canc. 19, 474

Götz, H., Bücherl, E.S. (1975) Applied Tumor Immunology, De Gruyter, Berlin

Goldstone, A.H., Kerr, L., Irvine, W.J. (1973) The Macrophage Electrophoretic Migration Test In Cancer. Clin.exp.Imm. 14, 469

Günther, M., Erdmann, Th. (1977) Zur Immundiagnostik urologischer Tumoren. Zschr.Urol. 70, 225

Häyry, P., Anderson, L.C., Nordling, S., Virolainen, M. (1972) Allograft response in vitro. Transpl.Rev. 12, 91

Halliday, W.J., Halliday, J.W., Campbell, C.B., Malnish, A.E., Powell, L.W. (1974) Specific immunodiagnosis of hepato-cellular carcinoma by leucocyte adherence inhibition. Br.Med.J. 2, 349

Halliday, W.J., Malnish, A.E., Little, J.H., Davis, N.C. (1975) Leucocyte adherence inhibition and specific immuno-reactivity in malignant melanoma. Int.J. Cancer 16, 645

Harlos, J.P., Weiss, L. (1978) Comparison between the MEM and FTEEM tests in the detection of cancer. Int.J.Cancer 21, 413

Halliday, W.J., Webb, M.(1969) Delayed hypersensitivity to chemically induced tumors and correlation with an in vitro test. J.Natl.Canc.Inst. 43, 141

Harmon, J.T., Hilf, R. (1976) Identification and charcterization of the insulin receptor in the R3230AC Mammary Adenocarcinoma of the rat. Cancer Research, 36, 3993

Harrington, J.T. (1974) Macrophage migration from an agarose droplet: a micromethod for assay of delayed hypersensitivity in the mouse. Cell.Imm. 12, 476

Hilberg, R.T., Balcerzak, S.P., Lo Buglio, A.F. (1973) A migration inhibition factor assay for tumor immunity in man. Cell.Imm. 7, 152

Holan, V., Hasek, M., Bubenik, J., Chutua, J. (1974) Antigen-mediated macrophage adherence inhibition. Cell.Imm., 13, 107

Hughes, D., Caspary, E.A., Field, E.J. (1970) Delayed hypersensitivity studies in experimental allergic encephalomyelitis; a comparison of macrophage migration inhibition test and electrophoretic mobility. Z.Immun.-Forsch. 141, 14

Iwaguchi, T., Sakurai, Y. (1974) Electrophoretic mobility of macrophage as a parameter of cell-mediated immunity. Gann, 65, 561

Jenssen, H.L., Köhler, H. Günther, J., Klausch, B., Straube, W., Hofmann, R., Büttner, HH. (1976) Macrophage Electrophoretic Mobility Test in Malignant Gynaecological Diseases. Arch. Gynäk. 220, 191

Jenssen, H.L., Werner, H., Köhler, H. (1976) Lymphokines which influence the electrophoretic mobility of macrophages. Acta biol.med.germ. 35, 1499

Jenssen, H.L., Eckert, R., Werner, H., Köhler, H., Pasternak, G., Friemel, H. (1977) Lymphokines of T and B cells. Oncology 34, 159

Jenssen, H.L., Werner, H., Köhler, H., Seyfarth, M., Friemel, H. (1977) Ein neues allgemeines Tumorantigen zum immunologischen Nachweis von Malignität. Dt.Gesundh.-Wesen 32, 1061

Jenssen, H.L., Shenton, B.K. (1975) Electrophoretic mobility test for lymphocyte sensitization using tanned sheep erythrocytes. Acta biol.med.germ. 34,12

Jacobs, B.B., Huseby, R.A. (1967) Neoplasms occurring in aged Fischer Rats, with special reference to testicular, Uterine, and thyroid tumors. J.Natl.Canc.Inst., 39, 303

Jones, B.M., Turnball, A.R. (1975) Horizontal studies of cellular immune reactions to autologuous tumor antigens in patients with operable mammary carcinoma. Br.J.Cancer 32, 339

Klausch, B., Straube, W., Hofmann, R., Büttner, H.H., Jenssen, H.L., Köhler, H., Günther, J. (1975) Erfahrungen mit dem MEM-Test bei der Diagnostik maligner gynäkologischer Tumoren. Zbl.Gynäk. 97, 529

Klein, G. (1966) Tumor Antigens. Ann.Rev.Microbiol. 20, 223

Kotzsch, M., Irmscher, J., Fischer, R., Heidl, G., Müller, M. (1976) Untersuchungen zur immunologischen Spezifität des MEM-Test bei Mäusen mit syngenen und allogenen Mammakarzinom-Transplantaten. Acta biol.med.germ. 35, 1749

Kronman, B.S., Wepsic, H.T., Churchill, W.H.J., Zbar, B., Brsoo, T., Rapp, H.J. (1969) Tumor specific antigens detected by inhibition of macrophage migration. Science 165, 296

Kurth, R. (1976) Biomembranes, 8, 167

Lampert, F., Nitzschke, U., Zwergel, T. (1977) Lympocyte sensitization in childhood solid tumors and lymphoblastic leukaemia, measured by electrophoretic mobility test. Br.J.Cancer 35, 844

Lennon, V.A., Wilks, A.V., Carnegie, P.R. (1970) Immunologic properties of the main encephalitogenic peptide from the basic protein of human myelin. J.Imm. 105 (5), 1223

Lewkonia, R.M., Kerr, E.J.L., Irvine, W.J. (1974) Clinical evaluation of the macrophage electrophoretic mobility test for cancer. Br.J.Cancer 30, 532

Lichtman, M.A., Weed, R.J. (1970) Electrophoretic mobility and N-acethyl neuraminic acid content of human normal and leucaemic lymphocytes and granulocytes. Blood, 35, 12

Mc Coy, J.L., Jerome, L.F., Dean, J.H., Cannon, G.B., Alford, T.C., Doering, T., Herberman, R.B. (1974) Inhibition of leucocyte migration by tumor associated antigens in soluble extracts of human breast carcinoma. J.Natl.Canc.Inst., 53, 11

Müller, M., Irmscher, J., Fischer, R., Grossmann, H. (1975) Immunologisches Tumorprofil, Dt.Gesundh.-Wesen, 39, 1836

Müller, M., Irmscher, J., Fischer, R., Heidl, G., Grossmann. H. (1977) Immunological Tumor Profile: Organ specific carcinoma diagnosis in patients employing the macrophage electrophoretic mobility test. Cancer Letters 2, 139

Meltzer, M.S., Leonard, E.J., Rapp, H.J., Borsos, T. (1971) Tumor specific antigen solubilized by hypertonic potassium chloride. J.Natl.Canc.Inst., 47 (3), 703

Meyer-Rienecker, H., Jenssen, H.L., Köhler, H., Günther, J., Gundlach, H.J. (1974) Zur Anwendung und Bedeutung des MEM-Test bei neurologischen Erkrankungen. Klin.Wschr. 52, 288

Moloney, W.C., Boschetti, A.E., King, V.P. (1970) Spontaneous Leukemia in Fischer Rats. Cancer Research 30, 41

Nitzschke, U., Zwergel, Th., Lampert. F. (1977) Electrophoretic Mobility Test for Childhood Cancer Diagnosis. Europ. J.Pediat. 428, 1

Oshiro, Y., Eylar, E.H. (1970) Allergic encephalomyelitis: a comparison of the encephalitogenic A1 protein from human and bovine brain. Arch.Biochem. and Biophys. 138, 606

Old, L.J., Boyse, E.A. (1964) Immunology of experimental tumors. Ann.Rev.Med. 15, 167

Palmer, F.B., Dawson, R.M.C. (1969) The isolation and properties of experimental allergic encephalitogenic protein. Biochem.J. 111, 629

Papageorgious, P.S., Henley, W.L., Glade, P.R. (1972) Production and characterization of migration inhibitory factor(s) (MIF) of established lymphoid and non-lymphoid cell lines. J.Imm. 108, 494

Pasternak, L., Jenssen, H.L., Köhler, H., Pasternak, G. (1976) Cross-reactions among mouse tumors of different etiology as detected by macrophage electrophoretic mobility test. Europ.J.Cancer 12, 389

Porzsolt, F., Tautz, Ch., Ax, W. (1975) Electrophoretic Mobility Test: Modifications to simplify the detection of malignant disease. Behring Inst.Mitt., 57, 128

Porzsolt, F., Mühlberger, G., Ax, W. (1975) Electrophoretic Mobility Test: Is there a correlation between clinical diagnosis and immunologic test for precancerous disease? Behring Inst.Mitt., 57, 137

Preece, A.W., Light, P.N. (1974) The Macrophage Electrophoretic Mobility Test for malignant disease. Further clinical investigations and studies on macrophage slowing factors. Clin.exp.Imm. 18, 543

Pritchard, J.A.V., Sutherland, W.H., Moore, J.L., Joslin, C.A.F. (1972) Macrophage Electrophoretic Mobility Test for malignant disease. An independant confirmation. Lancet ii, 627

Pritchard, J.A.V., Moore, J.L., Sutherland, W.H., Joslin, C.A.F., (1973) Evaluation and development of the macrophage electrophoretic mobility test for malignant disease. Br.J.Cancer, 27, 1

Rahi, A.H.S., Otiko, G., Winder, F., (1976) Evaluation of macrophage electrophoretic mobility test as an indicator of cellular immunity in ocular tumors. Brit.J.Pphthal., 60, 589

Rawlins, G.A., Wood, J.M.F., Bagshawe, K.D. (1976) Macrophage electrophoretic mobility with myelin basic protein. Br.J.Cancer 34, 613

Remold, H.G., David, R.A., David, R.J. (1972) Characterization of migration inhibitory factor (MIF) from guinea-pig lymphocytes stimulated with Con A. J. Imm. 109, 578

Rich, A.R., Lewis, M.R. (1928) Mechanism of allergy in tuberculosis. Proc.Soc.exp.Biol. 25, 596

Rees, R.C., Potter, C.W. (1973) Immune response to adenovirus 12-induced tumor antigens as measured in vitro by the macrophage migration inhibition test. Eur. J.Cancer 9, 497

Rocklin, R.E. (1974) Products of activated lymphocytes: leucocyte inhibitory factor distinct from migration inhibitory factor. J.Imm., 112, 1461

Rocklin, R.E. (1976) Mediators of cellular immunity, their nature and assay. J.Invest.Dermatology, 67, 372

Ruhenstroth-Bauer, G., Lücke-Huhle (1968) Two populations of small lymphocytes. J.Cell.Biol.37, 196

Sachtleben, P., Kramer, D., Schwartz, W., Seaman, G. V.F. (1967) Ein einfaches Zellelektrophoresegerät für kleine Materialmengen. Klin.W.schr. 45, 425

Sass, B., Rabstein, L., Madison, R., Nims, R.M., Peters, R.L., Kelloff, G.J. (1975) Incidence of spontaneous neoplasms in F344 rats throughout the natural life-span. J.Natl.Canc.Inst. 54,(6), 1449

Schäfer, W., (1977) Modellstudien über Virus-bedingte Tumoren und deren immunologische Behandlung. Klin.W.schr. 55, 835

Seaman, G.V.F., Heard, D.H., (1961) A microelectrophoresis chamber of small volume for use with biological systems. Blood, 18, 599

Segall, A., Wieler, O., Genin, J., Lacour, J., Lacour, F. (1972) Int.J.Cancer 9, 417

Shaw, A., Ettin, G., Mc Pherson, T.A. (1976) Responses of cancer patients in the MEM-test: not just a function of charge on basic proteins. Br.J.Cancer 34, 7

Shelton, J.B., Potter, C.W., Carr, I. (1976) Cellular immunity to myelin basic protein in man and in animal model systems as measured by the macrophage migration inhibition test. Br.J.Cancer 31, 528

Shenton, B.K., Hughes, D., Field, E.J. (1973) MEM-Test for lymphocyte sensitization: some practical experiences in macrophage selection. Br.J.Cancer 28, Suppl.I, 215

Shenton, B.K., Jenssen, H.L., Werner, H., Field, E.J. (1977) A comparison of the kinetics of the MEM and TEEM Tests. J.Imm.Meth. 14, 123

Smith, R.D., Hilf, R., Senior, A.E. (1977) Prolactin binding to R3230AC mammary carcinoma and liver in hormone-treated and diabetic rats. Cancer Res. 37, 595

Soborg, M. (1967) In vitro detection of cellular hypersensitivity in man. Acta.Med.Scand. 182, 167

Soborg, M., (1968) In vitro migration of human peripheral leucocytes in cellular hypersensitivity. Acta.Med.Scand. 184, 135

Sonozaki, H., Papermaster, V., Yoshida, T., Cohen, S. (1975) Desensitization: effects on cutaneous and peritoneal manifestations of delayed hypersensitivity in relation to lymphokine production. J.Imm. 115, 1657

Spitler, L.E., (1973) Cellular immunity to melanoma antigens in malignant melanoma. Clin.Res.21, 654

Stoltz, J.F., Stoltz, M., Peters, A., Collin, F., Larcan, A. (1969) Méthode de mesure de la mobilité électrophorétique de particules colloidales en suspension. J. Chemie Physique 66, 922

Sundaram K., Phondke, G.P., Ambrose, E.J., (1967) Electrophoretic mobilities of antigen stimulated lymph node cells. Immunol. 12, 21

Suter, L., Bloom, B.R., Wadworth, E.M., Oettgen, H.F. (1972) Use of the macrophage migration inhibition test to monitor fractionation of soluble antigens of chemically induced sarcomas of inbred guinea-pigs. J.Imm. 109, 766

Tautz,C., Khoen, F., Ax, W. (1974) Human leucocyte migration under agarose: migration inhibition by soluble and tumor associated antigens with special reference to antimelanoma activity in healthy blacks. Z.Immun.-Forsch. 147, 155

Taylor, M., Burman, C,J., Fantes, K.H. (1975) Problems encountered in the preparation of migration inhibitory factor (MIF) and mitogenic factor (MIT) from PHA-stimulated human peripheral lymphocytes and in preparations of MIF from human lymphoid cell lines (LCL). Cell. Imm., 19, 41

Tautz, C., Laier, E., Schneider, W., (1977) Der EM-Test, ein hochsensibler Malignom-Test. Mschr. Kinderheilk. 125, 456

Thor, D.E., Jureziz, R.E., Veach, S,R., Miller, E., Dray, S.(1968) Cell migration inhibition factor released by antigen from human peripheral lymphocytes. Nature, 219, 755

Tubergen, D.G., Feldman, J.D., Pollack, E.M., Lerner, R.A. (1972) Production of macrophage migration inhibition factor by continuous cell lines. J.Exp.Med. 135, 255

Vaage, J., Jones, R.D., Brown, B.W. (1972) Tumor specific resistence in mice detected by inhibition of macrophage migration. Cancer Research 32, 680

Werner, H., Jenssen, H.L., Köhler, H., von Broen, B., Pasternak, G., Thuy, T., Schlott, B., Pasternak. L. (1978) Cellular sensitization in tumor-bearing mice to soluble extracts from normal and malignant tissue. Europ. J.Cancer 14, 485

Westall, F.C., Robinson, A.B., Caccam, J., Jackson, J., Eylar, E.H. (1971) Essential chemical requirements for induction of allergic encephalomyelitis. Nature, 229, 22

Westall, F.C., Thompson, M. (1977) Encephalitogenic regions for the Lewis rat within the myelin basic protein. Imm. Communications 6 (1), 13

Wittliff, J.L., Metha, R., Boyd, P., Goral, J. (1975) Steroid-binding proteins of the mammary gland and their significance in breast cancer. J.Toxicol. Environ. Health Suppl., 1,231

Yoshida, T., Cohen, S. (1974) Lymphokine activity in vivo in relation to circulating monocyte levels and delayed skin reactivity. J.Imm. 112, 1540

Yoshida, T., Bigazzi, P.E., Cohen, S. (1975) The production of anti-guinea pig lymphokine antibodies. J.Imm. 114, 68

Yoshida, T., Edelson, R., Cohen, S., Green, J, (1975) Migration inhibitory activity in serum and cell supernatants in patients with Sezary-Syndrome. J.Imm. 114, 915

Lebenslauf

Am 14. Februar 1952 wurde ich als Sohn des kaufmännischen Angestellten Georg Harthus und seiner Ehefrau Elise, geb. van Deest, in Oldenburg (Niedersachsen) geboren.
Von 1958 bis 1962 besuchte ich die Volksschule Bürgerfelde, von 1962 bis 1970 das Neue Gymnasium Oldenburg, an dem ich im Mai 1970 das Abitur ablegte.
Zum Wintersemester 1970/71 begann ich in Braunschweig das Studium der Biologie, das ich jedoch nach dem ersten Semester unterbrechen mußte, um meinen Wehrdienst abzuleisten.
Im Wintersemester 1972/73 nahm ich dann mein Studium wieder auf und bestand im August 1974 das Vordiplom.
Seit Oktober 1974 studiere ich an der Philipps Universität Marburg Humanbiologie mit dem Hauptfach Medizinische Mikrobiologie und den Nebenfächern Biochemie und Anatomie.
Mit der vorliegenden Arbeit habe ich im Januar 1977 begonnen und den experimentellen Teil im Dezember 1978 abgeschlossen.

Für die Überlassung des Arbeitsplatzes in den Forschungslaboratorien der Behringwerke AG (Leitung Prof. Dr. H.-G. Schwick), Marburg/Lahn, Abteilung Biochemie (Leitung Dr. F. Seiler) möchte ich mich hiermit herzlich bedanken.
Den Herren Drs. Sedlacek, Dersjant und Bengelsdorff danke ich für wertvolle Anregungen und Unterstützung bei der Etablierung des Ratten-Tumormodells sowie den Herren Drs. Abel und Hofstaetter für wertvolle Vorschläge bei der Durchführung der biochemischen Untersuchungen.
Herrn Biel, Abteilung Mikrobiologie (Leitung Dr. O. Zwisler) danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der Polyacrylamid-Gelelektrophoresen.
Herrn Dr. Johannsen möchte ich hiermit besonders für die wertvolle Diskussion und Hilfsbereitschaft während meiner Dissertation danken.
Die technische Assistenz von Herrn Ellrich bei den chirurgischen Tiereingriffen wird ebenfalls anerkannt.

An dieser Stelle möchte ich mich besonders herzlich für die Überlassung des Themas sowie die Betreuung der Arbeit bei Herrn Prof. Dr. W. Ax bedanken.
Durch seine Anleitung zum selbstständigen experimentellen Arbeiten sowie die unermüdliche Bereitschaft zur Diskussion über Inhalt und Aussagekraft der einzelnen Experimente hat Herr Prof. Ax einen wesentlichen Beitrag zu meiner wissenschaftlichen Erziehung geleistet.
Außerdem möchte ich mich für die vielen Anregungen und Impulse, die er der Doktorarbeit gegeben hat, bedanken.

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren:

Amon, Ax, Aziz, Beato, Braasch, Gallwitz, Hartmann, Havemann, Hennessen, Karlson, Kaffarnik, von Kraft, Kohlhage, Ludwig, Mannheim, Niessing, Schachtschabel, Schaumlöffel, Schiff, Schwick, Schneider, Seifart, Siegert, Slenczka, Wiegandt, Wesemann